

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Universitätsklinikum Essen  
Institut für Immunologie

# **Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von humanen natürlichen regulatorischen T-Zellen und T-Effektorzellen**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n  
zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Britta Kraczyk  
aus Herne  
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. C. Hardt  
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. R. Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2014

## Publikationen

### Manuskript in Vorbereitung:

**Kraczyk, B.**, Remus, R., Hardt, C.: Differential suppressive capacity of human CD49d<sup>-</sup> and CD49d<sup>+</sup> regulatory T cells towards CD45RA<sup>+</sup> and CD45RA<sup>-</sup> effector T cells.

### Präsentationen

**Kraczyk, B.**, Remus, R., Hallmann, K., Hardt, C.: *LILRB4* (ILT3): A candidate gene for predisposition to autoimmune diseases. 23<sup>rd</sup> European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Mai 2009, Ulm; Vortrag

**Kraczyk, B.**, Remus, R., Hardt, C.: Regulatory T Cells in Humans: Purity and Functional Efficiency “IRUN Symposium on Recognition of Pathogens and Tumours”, Oktober 2011, Mülheim an der Ruhr; Posterpräsentation

**Kraczyk, B.**, Remus, R., Hardt, C.: Improvement of T cell suppression by highly purified Treg and Teff cells. Annual Retreat of Graduate School of Biomedical Science (BIOME), November 2012, Hamminkeln; Vortrag

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Das Immunsystem</b>	<b>6</b>
1.1.1 Die angeborene Immunantwort	6
1.1.2 Die adaptive Immunantwort	8
<b>1.2 Immunologische Selbst-Toleranz</b>	<b>9</b>
1.2.1 Zentrale Toleranz	9
1.2.2 Periphere Toleranz	10
<b>1.3 CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten</b>	<b>11</b>
1.3.1 T-Helferzellen (T <sub>H</sub> 1-Zellen)	12
1.3.2 T-Helferzellen (T <sub>H</sub> 2-Zellen)	13
1.3.3 T-Helferzellen (T <sub>H</sub> 17-Zellen)	13
1.3.4 Follikuläre T-Helferzellen (T <sub>H</sub> 17-Zellen)	14
1.3.5 Induzierte regulatorische T-Zellen: T <sub>R</sub> 1 und T <sub>H</sub> 3-Zellen	14
<b>1.4 Natürliche regulatorische T-Zellen (nT<sub>REGS</sub>)</b>	<b>15</b>
1.4.1 Entwicklung von nT <sub>REGS</sub>	16
1.4.2 Phänotypische Charakterisierung von nT <sub>REGS</sub>	16
1.4.3 Suppressionsmechanismen von nT <sub>REGS</sub>	19
1.4.4 Regulatorische T-Zellen und Autoimmunerkrankungen	22
<b>1.5 Zielsetzung</b>	<b>24</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Material und Blutspender</b>	<b>27</b>
2.1.1 Blutspender	27
2.1.2 Chemikalien und sonstige Reagenzien	27
2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen	28
2.1.4 Kommerzielle Standardtests (Kits)	28
2.1.5 Antikörper, Seren und Fluorochrome	29
2.1.6 Geräte	31
2.1.7 Software	31
2.1.8 Verbrauchsmaterial	32
<b>2.2 Methoden</b>	<b>33</b>
2.2.1 DNA Isolierung aus Blutproben	33
2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	33
2.2.3 Isolierung humaner mononukleärer Zellen	34
2.2.4 Bestrahlung von Zellen	34
2.2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Neubauer-Zählkammer	34
2.2.6 Magnetische Zellsortierung	35
2.2.7 Antikörperfärbung	37
2.2.8 Durchflusszytometrie	37
2.2.9 <i>In vitro</i> Analyse von humanen regulatorischen T-Zellen	40
2.2.10 Statistik	41

<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Analyse von MACS-isolierten nT<sub>REG</sub>- und T<sub>EFF</sub>-Zellen</b>	<b>43</b>
3.1.1 Optimierung des <i>in vitro</i> Suppressions-Tests	44
3.1.2 Funktionelle Analyse syngener <i>versus</i> allogener CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>REGS</sub>	46
<b>3.2 Durchflusszytometrische Analyse von T<sub>REG</sub>- und T<sub>EFF</sub>-Zellen</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Heterogenität von T<sub>EFF</sub>-Zellen</b>	<b>53</b>
3.3.1 Supprimierbarkeit von CD25 <sup>-</sup> <i>versus</i> CD25 <sup>low</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	53
3.3.2 Supprimierbarkeit von CD127 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> <i>versus</i> CD127 <sup>+</sup> CD25 <sup>low</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	54
3.3.3 Supprimierbarkeit von CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> <i>versus</i> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	55
<b>3.4 Heterogenität von T<sub>REG</sub>-Zellen</b>	<b>56</b>
3.4.1 Suppressivität von CD25 <sup>high</sup> CD49d <sup>-</sup> <i>versus</i> CD25 <sup>high</sup> CD49d <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen	56
3.4.2 Suppressivität von CD25 <sup>high</sup> CD49d <sup>-</sup> <i>versus</i> CD25 <sup>high</sup> CD49d <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen gegenüber CD45RA <sup>+</sup> oder CD45RA <sup>-</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	58
3.4.3 Suppressivität von CD25 <sup>high</sup> CD49d <sup>-</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen aus peripherem Blut	61
<b>3.5 Einfluss des Kulturmediums auf die Proliferation und Suppression von T<sub>REG</sub>-Zellen</b>	<b>64</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Methodische Aspekte</b>	<b>68</b>
<b>4.2 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T<sub>REGS</sub></b>	<b>70</b>
<b>4.3 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T<sub>EFFS</sub></b>	<b>73</b>
<b>4.4 Regulatorische T-Zellen in der klinischen Anwendung</b>	<b>77</b>
<b>4.5 Schlussfolgerung</b>	<b>79</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>81</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>82</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>93</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis	93
7.2 Abbildungsverzeichnis	95
7.3 Tabellenverzeichnis	96
<b>8 DANKSAGUNG</b>	<b>97</b>
<b>9 LEBENSLAUF</b>	<b>98</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, die Integrität des Individuums zu erhalten, indem es auf Einflüsse von „außen“ (Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten) sowie von „innen“ (entartete, körpereigene Zellen) reagiert. Das Immunsystem wird in angeborene (unspezifische) und adaptive (spezifische) Immunantworten unterteilt.

Die Immunzellen werden im Knochenmark aus  $CD34^+CD123^+$  (Interleukin-3 Rezeptor  $\alpha$ ; IL-3R $\alpha$ ) hämatopoetischen Stammzellen gebildet und differenzieren entweder aus lymphoiden oder myeloiden Vorläuferzellen. Zellen lymphoider Abstammung reifen in den primären lymphatischen Organen, dem Knochenmark und dem Thymus. T-Lymphozyten reifen im Thymus, während sich B-Lymphozyten, natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und plasmazytoide dendritische Zellen (*dendritic cell*; DC) im Knochenmark entwickeln. Nach ihrer Reifung besiedeln die Immunzellen die sekundären lymphatischen Organe: Milz, Lymphknoten, Lymphfollikel, Peyersche Plaques sowie das mukosa-assoziierte Gewebe. Reife naive T- und B-Lymphozyten zirkulieren über Blut und Lymphgefäßsystem und differenzieren nach Antigenkontakt. B-Lymphozyten differenzieren in Antikörper-sezernierende Plasmazellen und vermitteln die spezifische humorale Immunabwehr. T-Lymphozyten Subpopulationen differenzieren in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Effektoren und vermitteln die zelluläre Immunantwort. Zellen myeloider Abstammung (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, DCs) verlassen das Knochenmark als reife oder unreife Zellen und besiedeln das periphere Gewebe. Ihre Differenzierung findet in Abhängigkeit des Mikromilieus statt. Sie vermitteln die unspezifische Immunabwehr.

### 1.1.1 Die angeborene Immunantwort

Eine primäre, passive Barriere gegen eindringende Krankheitserreger bilden die Haut und die Schleimhäute. Die Zellen des angeborenen Immunsystems ermöglichen eine sofortige, aber nicht spezifische Immunantwort gegen Pathogene. Sie besitzen spezielle Mustererkennungszellrezeptoren (*pattern recognition receptor*; PRR), mit denen sie an konservierte Strukturen (*pathogen-associated molecular pattern*; PAMP) der Mikroorganismen binden. Beispiele für PAMPs sind Lipopolysaccharide, bakterielle DNA und doppelsträngige RNA (RNA-Viren). Zu den PRRs gehören u. a. die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptor*;

TLR) und NOD-ähnliche Rezeptoren (*NOD-like receptor*, NLR). Die PRRs werden hauptsächlich von DCs, Makrophagen und Monozyten (alle CD14<sup>+</sup>) exprimiert. Die Aktivierung von PRRs führt zur Sekretion inflammatorischer Zytokine und Interferone, so dass weitere Immunzellen zum Infektionsort gelockt und aktiviert werden. Weitere zelluläre Effektoren des angeborenen Immunsystems sind NK-Zellen (CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>), Mastzellen und Granulozyten (Neutrophile, Basophile, Eosinophile). Darüber hinaus trägt das Komplementsystem, eine Gruppe von etwa 35-40 löslichen Proteinen im Blutplasma und der Lymphe, zur Elimination von Infektionserregern bei. Über die sofortige Aktivierung des Komplementsystems werden Pathogene entweder über Opsonierung oder Zytotoxizität eliminiert (Carroll & Sim 2011). NK-Zellen richten sich hauptsächlich gegen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen. Die Aktivität der NK-Zellen wird kontrolliert über ihre aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren und der Interaktion mit den jeweiligen Liganden auf den Zielzellen. Bei Kontakt mit nicht veränderten körpereigenen MHC-Klasse I-Molekülen (*major histocompatibility complex*; MHC) überwiegt das inhibierende Signal. Werden die MHC-Klasse I-Moleküle durch Präsentation von Viruspeptiden oder Tumorantigenen verändert, kann das inhibierende Signal aufgehoben und die Zielzellen lysiert werden (Hypothese des veränderten Selbst/Nicht-Selbst). Einige Tumorzellen und Viren sind in der Lage, die Präsentation von MHC-Klasse I-Molekülen auf ihrer Oberfläche zu unterdrücken und entgehen so der Zerstörung durch T-Lymphozyten. Eine verminderte Expression der MHC-Moleküle wird von NK-Zellen erkannt und führt zu einer Aufhebung inhibitorischer Signale und zytotoxischer Aktivität von NK-Zellen gegenüber den Zielzellen (*missing-self-hypothesis*; Finton & Strong 2012).

Mastzellen vermitteln eine Allergie vom Typ I. Nach einer primären Immunaktivierung differenzieren B-Lymphozyten in Plasmazellen und sezernieren allergenspezifische IgE-Antikörper. Diese binden an hochaffine Fcε-Rezeptoren auf Mastzellen. Ein erneuter Allergenkontakt bewirkt eine Quervernetzung von IgE und Fcε-Rezeptoren sowie eine Freisetzung von Histamin aus präformierten Granula der Mastzellen und eine sofortige allergische Reaktion (Gilfillan & Beaven 2011). Neutrophile Granulozyten eliminieren Pathogene sowohl intra- als auch extrazellulär. Erreger werden über Phagozytose in Phagosomen aufgenommen. Über zwei induzierbare Enzymsysteme, das NADPH-abhängige Oxidasesystem und das stickoxidgenerierende Enzym (iNOS), sowie über antibakterielle Proteine (Kathepsine, Defensine, Lysozyme) werden die Bakterien eliminiert. Die antibakteriellen Proteine werden von den neutrophilen Granula entweder in die Phagosomen oder in das extrazelluläre Milieu freigesetzt. Hoch aktivierte Neutrophile Granulozyten können extrazelluläre Mikroorganismen auch über eine extrazelluläre Matrix (*neutrophil extracellular trap*; NET) an sich binden und eliminieren (Kolaczkowska & Kubes 2013).

DCs und Makrophagen bilden als Antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cell*; APC) eine wichtige Bindestelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Sie prozessieren sowohl intra- als auch extrazelluläre Antigene und präsentieren sie im MHC-Peptid-Komplex naiven T-Lymphozyten. Hiermit initiieren sie die adaptive Immunantwort (Kadowaki *et al.* 2012).

### 1.1.2 Die adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunantwort ist nur bei höheren Organismen entwickelt und weist eine hohe Antigenspezifität auf. Zu den Zellen der adaptiven Immunabwehr zählen neben den APCs (Makrophagen und DCs), die  $CD19^+$  B- und  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Lymphozyten. Diese sind in der Lage mittels spezieller Oberflächenrezeptoren Antigene zu erkennen.

Die Antigenrezeptoren der B-Lymphozyten (*B cell receptor*, BCR) sind membranverankerte Immunglobuline. Nach Bindung eines Antigens an den BCR auf der Zelloberfläche eines B-Lymphozyten wird diese aktiviert. Hierzu ist die Interaktion mit T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen) erforderlich. Der B-Lymphozyt proliferiert und differenziert zu Plasmazellen, die Antikörper mit derselben Antigenspezifität bilden. Die Charakteristika unterschiedlicher Antikörperklassen, entweder IgM, IgG, IgE oder IgA bestimmen die Immunreaktivität wie z. B. Komplement-vermittelte Lyse, Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*; ADCC) von NK-Zellen, Neutralisation von Viren oder Toxinen, Aktivierung von Mastzellen oder Vermittlung von oraler Toleranz.

Jeder T-Lymphozyt trägt auf seiner Oberfläche einen membrangebundenen T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) einer einzigen Spezifität. Die TCRs entstehen infolge der zufälligen Kombination variabler Rezeptorsegmente (*variable diversity joining*; VDJ) und der paarweisen Zusammenlagerung von jeweils zwei verschiedenen Polypeptidketten, entweder  $\alpha$  und  $\beta$  oder  $\gamma$  und  $\delta$ . Etwa 95 % aller T-Lymphozyten exprimieren den  $\alpha\beta$ -TCR und ungefähr 5 % einen  $\gamma\delta$ -TCR. Die spezifischen TCRs sind mit dem transmembranen CD3-Komplex assoziiert, bestehend aus den Heterodimeren  $CD3\epsilon\gamma$  und  $CD3\epsilon\delta$  sowie dem Homodimer  $CD3\zeta\zeta$  (Birnbaum *et al.* 2012). Die T-Lymphozyten tragen entweder den Co-Rezeptor CD4 oder CD8 (Gao *et al.* 2002).  $CD4^+$  T-Zellen interagieren mit MHC-Klasse II-Molekülen und  $CD8^+$  T-Zellen mit MHC-Klasse I-Molekülen der APCs. Darüber hinaus tragen die Lymphozyten Zellinteraktionsmoleküle wie z. B. CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen*) sowie Integrine wie z. B. LFA-1 (Leukozyten-Funktions-Antigen). Bei dem Kontakt zwischen T-Lymphozyten und APCs bilden die Zelloberflä-



chenmoleküle eine immunologische Synapse. Es kommt jedoch nur dann zur T-Zellaktivierung, wenn das TCR-spezifische Antigen von den APCs präsentiert wird und eine ausreichende Interaktion der beteiligten Interaktionspartner (Rezeptoren und Liganden) gewährleistet ist (Angus & Griffiths 2013). Die Aktivierung von naiven  $CD45RA^+$  T-Lymphozyten induziert die Differenzierung in  $CD45RO^+$  Effektorzellen sowie in Gedächtniszellen, so dass bei einem Zweitkontakt mit dem gleichen Antigen eine schnellere und effektivere Immunantwort ermöglicht wird. Diese Reaktivierung setzt voraus, dass das spezifische Antigen wiederum über identische MHC-Moleküle, in der Regel den körpereigenen, präsentiert wird. Diese strikte Forderung des gleichen Antigens (z. B. virales Peptid A) und körpereigenem MHC-Allel während der Stimulation und Effektorphase wird als MHC-Restriktion bezeichnet (Zinkernagel & Doherty 1974). Die Präsentation viraler Peptide, z. B. „A“ über fremde MHC-Moleküle oder viraler Peptide, z. B. „B“ über körpereigene MHC-Moleküle würde in diesem Fall keine Reaktivierung induzieren. Die Aktivierung des TCRs leitet die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu zytotoxischen T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocyte*; CTL) oder  $T_H$ -Zellen ein.  $T_H1$ -Zellen sind für die Differenzierung von CTLs notwendig. Sie können aber auch selbst Effektorfunktionen ausüben wie z. B. zytotoxische Aktivität oder die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen.  $CD8^+$  T-Zellen produzieren zytotoxische Moleküle wie Perforin sowie Granzym und lysieren virusinfizierte Zellen.

## 1.2 Immunologische Selbst-Toleranz

Die beiden Polypeptidketten des TCR und BCR werden nach dem Zufallsprinzip aus verschiedenen V und J bzw. VDJ Elementen gebildet. Aus den Kombinationsmöglichkeiten ergeben sich jeweils mehr als  $10^{12}$  verschiedene Antigenspezifische Rezeptoren. Das birgt die Gefahr, dass auch Rezeptoren gebildet werden, die spezifisch für körpereigene Peptide sind. Diese potentiell autoreaktiven Lymphozyten werden über zentrale und periphere Toleranzmechanismen eliminiert und kontrolliert.

### 1.2.1 Zentrale Toleranz

Die Mechanismen der zentralen Toleranz spielen sich während der Differenzierung unreifer T-Lymphozyten im Thymus ab. Dabei stellt die klonale Deletion den wichtigsten Prozess dar. T-Lymphozyten, deren TCR eine starke Affinität zu Selbst-Antigenen aufweisen,

werden negativ selektioniert (Starr *et al.* 2003). Sie werden nach Aktivierung des Todes-rezeptorliganden TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) über Apoptose eliminiert. T-Lymphozyten, die einen TCR mit geringer Affinität für Selbst-Antigene aufweisen, werden positiv selektioniert und gelangen in die Peripherie. Die Expression von Selbst-Antigenen im Thymus ist von zentraler Bedeutung und wird durch das Autoimmun-Regulator-Gen (AIRE) gewährleistet. Mutationen in diesem Transkriptionsfaktor führen zu einer autosomal-rezessiven Autoimmunerkrankung, dem APECED-Syndrom (*autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*). Diese Erkrankung ist charakterisiert durch Autoreaktivität gegen endokrine Organe und führt zu Diabetes mellitus, Morbus Addison und Schilddrüsenerkrankungen sowie ektodermaler Dystrophie und Candidiasis (Capalbo *et al.* 2012).

### 1.2.2 Periphere Toleranz

Trotz des negativen Selektionsprozesses im Thymus migrieren einige potentiell autoreaktive T-Zellen aus dem Thymus in die peripheren lymphatischen Organe. Kontrollmechanismen der peripheren T-Zell Toleranz werden entsprechend ihrer Wirkungsweise in passive, intrinsische und aktive, extrinsische Mechanismen unterteilt (Walker & Abbas 2002).

Bei der Ignoranz bleibt die Induktion autoreaktiver Effektor-T-Lymphozyten aus, weil sie nicht mit den potentiellen Autoantigenen in immunprivilegierten Geweben (z. B. Gehirn, Plazenta, Hoden) in Kontakt kommen oder das Antigen nur in einer geringen Menge von APCs präsentiert wird. Eine fortwährende Stimulation von T-Lymphozyten mit einem Autoantigen induziert eine vermehrte Expression des Oberflächenantigens CD95 (Fas, APO-1) und führt über das Fas/Fas-Liganden (FasL oder CD95L) System zu einem aktivierungsinduzierten Zelltod (*activation induced cell death*; AICD) (Green *et al.* 2003). Mutationen im FAS-Gen sind mit der autosomal-dominanten Autoimmunerkrankung ALPS (*autoimmune lymphoproliferate syndrom*) assoziiert. Diese Erkrankung ist charakterisiert durch eine Akkumulation nicht maligner Lymphozyten (Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie), autoimmunhämolytische Anämie und Thrombozytopenie und einem erhöhten Risiko für maligne Lymphome wie z. B. dem Hodgkin-Lymphom (Rieux-Laucat *et al.* 2003). Charakteristisch ist eine erhöhte Anzahl von  $CD3^+CD4^-CD8^-$  T-Lymphozyten im peripheren Blut, die bei Gesunden weniger als 2 % beträgt.

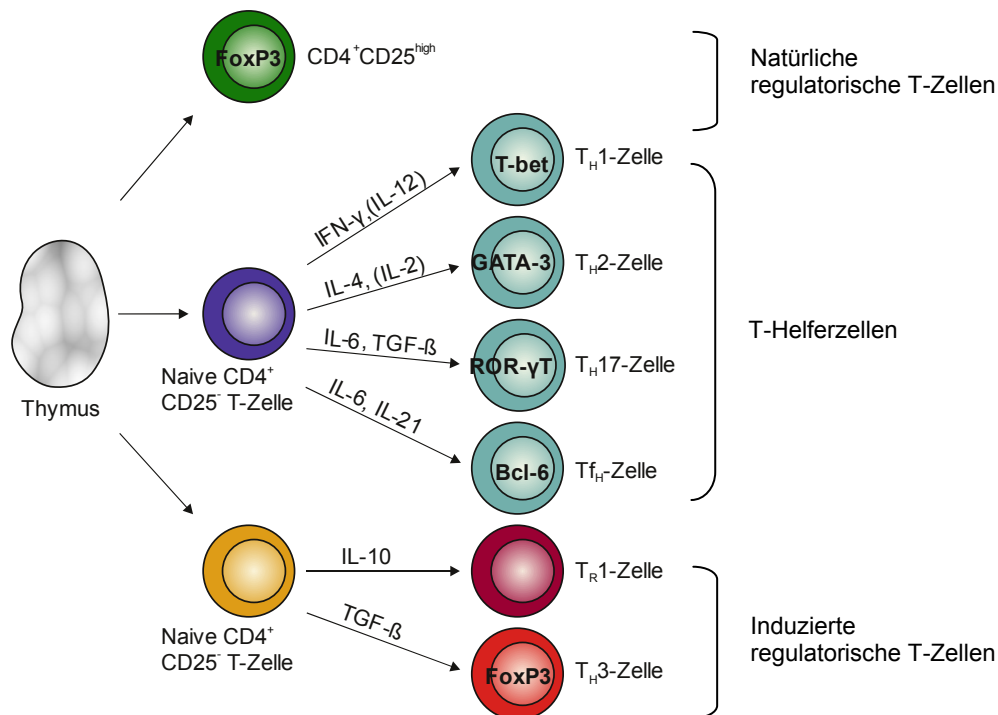
Das Erkennen von Autoantigenen kann zu einer funktionellen Inaktivierung von T-Lymphozyten führen, wenn kostimulierende Signale fehlen. Dieser Zustand der

T-Lymphozyten wird als Anergie bezeichnet. Alternativ kann Anergie über inhibitorische Rezeptoren wie z. B. CTLA-4 (CD152) vermittelt werden. CTLA-4 ist ein Homolog des T-Zell kostimulierenden Rezeptors CD28. Beide binden kompetitiv an die Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). Eine hohe Expression von CTLA-4 verhindert eine Aktivierung (Walunas & Bluestone 1998), während das Fehlen von CTLA-4 oder Vorkommen von Polymorphismen im CTLA-4 eine Aktivierung der T-Zelle ermöglicht und mit Autoimmunerkrankungen assoziiert ist.

Extrinsische Toleranzmechanismen werden über spezialisierte Zellen des Immunsystems vermittelt. Zu diesen Zellen gehören neben tolerogenen DCs insbesondere natürliche regulatorische T-Zellen ( $nT_{REGS}$ ), die autoreaktive T-Lymphozyten hemmen können und in der Peripherie vor Autoimmunität schützen. Die Antigenpräsentation auf DCs im immunologischen *steady-state* (Abwesenheit von Infektionen) induziert periphere T-Zell Toleranz in  $CD4^+$  T-Lymphozyten (Hawiger *et al.* 2001) und  $CD8^+$  T-Lymphozyten (Bonifaz *et al.* 2002). *Steady-state* DCs präsentieren kontinuierlich Selbst-Antigene, wodurch potentiell autoreaktive T-Zellen tolerisiert werden (Steinman *et al.* 2003). Somit übernehmen DCs eine zentrale Funktion in der Induktion peripherer Toleranz.

### 1.3 $CD4^+$ T-Lymphozyten

In der Peripherie differenzieren naive  $CD4^+$  T-Lymphozyten nach T-Zell vermittelter Aktivierung in verschiedene  $T_H$ -Effektor T-Zellen ( $T_{EFFS}$ ). Die Differenzierung in  $T_H$ -Zell-Subpopulationen wird bestimmt von den jeweils erhaltenen Signalen und dem Zytokinmilieu. Anhand der Funktion, der Expression von Transkriptionsfaktoren sowie der Zytokinsekretion lassen sich vier Zelllinien klassifizieren: die  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  und  $T_H$ -Zellen (follikuläre  $T_H$ -Zellen) sowie die induzierten  $T_{REGS}$  (*inducible*  $T_{REG}$ ;  $iT_{REG}$ ), die  $T_R1$  und  $T_H3$ -Zellen (Abb. 1). Darüber hinaus wurden IL-9 produzierende  $T_H9$ - und IL-22 produzierende  $T_H22$ -Zellen beschrieben (Veldhoen 2009). Ob es tatsächlich separate Zelllinien sind, wird noch kontrovers diskutiert. Die Produktion von Zytokinen wird über die Aktivierung sogenannter STAT-Proteine (*signaling transducer and activator of transcription*) reguliert.



**Abb. 1: Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten**

Natürliche CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen differenzieren im Thymus, während naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in der Peripherie differenzieren. Unter Einfluss der o. g. Zytokine entwickeln sich naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 oder T<sub>fH</sub>-Zellen. Unter Einwirkung von IL-10 oder TGF-β werden aus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen die iT<sub>REGS</sub> T<sub>R</sub>1 und T<sub>H</sub>3.

### 1.3.1 T-Helferzellen (T<sub>H</sub>1-Zellen)

T<sub>H</sub>0-Zellen entwickeln sich nach TCR-Stimulation in Gegenwart von IL-12 und IFN-γ in T<sub>H</sub>1-Zellen. IL-12 induziert über STAT4 die Produktion von IFN-γ, während IFN-γ über STAT1 das Hauptregulator-Gen T-bet aktiviert, welches nun autokrin die IFN-γ Produktion stimuliert (Thierfelder *et al.* 1996; Afkari *et al.* 2002). T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren hauptsächlich die proinflammatorischen Zytokine IFN-γ, Lymphotoxin (LT-α) und IL-2 (Mosmann & Coffman 1989). T<sub>H</sub>1-Zellen stimulieren über die Sekretion von IFN-γ die Phagozytoseaktivität und die antibakterielle Wirksamkeit von Makrophagen und tragen so zur Elimination von extrazellulären und intrazellulären Erregern bei. Die Elimination von virusinfizierten Zellen erfolgt über eine Aktivierung und Differenzierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. T<sub>H</sub>1-Zellen bzw. ihre proinflammatorischen Zytokine spielen aber auch eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen, indem sie Makrophagen und Mikrogliazellen aktivieren und zu einer chronischen Entzündungsreaktion beitragen.

### 1.3.2 T-Helferzellen (T<sub>H</sub>2-Zellen)

T<sub>H</sub>2-Zellen differenzieren aus naiven T-Zellen in Gegenwart von IL-2 und IL-4. IL-2 aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT5 (Kaplan *et al.* 1996). IL-4 induziert den Transkriptionsfaktor STAT6, der das Hauptregulator-Gen GATA-3 (*trans-acting T-cell specific transcription factor*) aktiviert. Sowohl GATA-3 als auch STAT6 und STAT5 kooperieren in der Transkription eines für T<sub>H</sub>2-Zellen typischen Zytokinprofils (Zhu *et al.* 2006). T<sub>H</sub>2-Zellen sezernieren hauptsächlich die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-25. IL-25 induziert die Bildung von IL-13 und erhöht die Produktion von IL-4 und IL-5. T<sub>H</sub>2-Zellen sind an der Immunantwort gegenüber extrazellulären Bakterien sowie Helminthen beteiligt und spielen vor allem eine Rolle bei allergischen Reaktionen und chronischem Asthma (O'Garra & Arai 2000). IL-4 induziert im Rahmen allergischer Reaktionen den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgE und die verstärkte Expression von IgE spezifischen Fcε-Rezeptoren auf Mastzellen. IL-9 und IL-13 tragen zu allergischem Asthma bei. IL-5 und IL-13 sind an der Aktivierung von Eosinophilen Granulozyten beteiligt und somit an der Abwehr von Parasiten. Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 trägt zur Immunhomöostase bei, indem es T<sub>H</sub>1-Zellen inhibiert.

### 1.3.3 T-Helferzellen (T<sub>H</sub>17-Zellen)

An der Differenzierung der T<sub>H</sub>17-Zellen sind IL-6, IL-21, IL-23 und TGF-β beteiligt. Der Differenzierungsprozess kann in drei wesentliche Stufen eingeteilt werden: die Entwicklung der T<sub>H</sub>17-Zellen wird von TGF-β und IL-6 eingeleitet, es folgt die Weiterdifferenzierung unter Einwirkung von IL-21 und zuletzt eine Stabilisierungsstufe mit Beteiligung des Zytokins IL-23 (Luckheeram *et al.* 2012). IL-6 und in geringer Konzentration auch TGF-β induzieren die Differenzierung der T<sub>H</sub>17-Zellen. Da TGF-β auch die Bildung von IL-21 induziert und die Expression von IL-23R hoch reguliert, gehört es zu den wichtigen Zytokinen, die an der Entwicklung der T<sub>H</sub>17-Zellen beteiligt sind (Mangan *et al.* 2006; Veldhoen *et al.* 2006). Hauptsächlich IL-6, aber auch IL-21 und IL-23 induzieren über STAT3 die Aktivierung des Hauptregulator-Gens ROR-γt (*retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-T*) (Ivanov *et al.* 2006). Eine Überexpression von ROR-γt induziert die Bildung von IL-17A und IL-17F, während T<sub>H</sub>17-Zellen die kein ROR-γt exprimieren nur geringe Mengen an IL-17 bilden. STAT3 kann ebenfalls die Transkription von IL-17A und IL-17F induzieren (Chen & O'Shea 2008). RORα, ein weiteres Mitglied der ROR-Familie, wirkt synergistisch mit ROR-γt bei der Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen. Ist keiner der bei-

den Transkriptionsfaktoren aktiviert, führt dies zu einem Abbruch der  $T_H17$ -Differenzierung (Yang *et al.* 2008).  $T_H17$ -Zellen sind an der Immunabwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen beteiligt. Infolge der Sekretion von IL-17 wandern Neutrophile Granulozyten in das Infektionsgebiet. IL-17 führt zu der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-1 und TNF- $\alpha$ . Proinflammatorische Chemokine gewährleisten die Chemotaxis von inflammatorischen Zellen zu den Orten der Entzündung.  $T_H17$ -Zellen sind bei der Entstehung von verschiedenen Autoimmunerkrankungen beteiligt. Es wurde beschrieben, dass sowohl bei der Multiplen Sklerose (MS) als auch dem Mausmodell, der experimentellen Autoimmun Enzephalomyelitis (*experimental autoimmune encephalomyelitis*; EAE) eine erhöhte Anzahl von  $T_H17$ -Zellen im zentralen Nervensystem und in der Peripherie vorkommt (Komiyama *et al.* 2006; Brucklacher-Waldert *et al.* 2009).

#### 1.3.4 Follikuläre T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen)

Naive  $T_H$ -Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7, den sie nach Aktivierung herunterregulieren. Stattdessen wird CXCR5 hochreguliert, der ihnen als *homing*-Rezeptor für die Migration in die B-Zell-Follikel dient, in denen sich das Keimzentrum bildet. Dabei sezernieren  $T_H$ -Zellen IL-21, das die B-Zellen für ihre Reifung benötigen (Luckheerem *et al.* 2012).  $T_H$ -Zellen sind durch die Expression verschiedener Rezeptoren definiert. Dazu gehören neben dem bereits erwähnten CXCR5, der ICOS-Rezeptor (*inducible T cell costimulator*) und der PD-1-Rezeptor (*programmed cell death-1*). Die Expression des Transkriptionsfaktors Bcl-6 unterscheidet  $T_H$ -Zellen von den anderen  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen (Cerutti *et al.* 2012).  $T_H$ -Zellen sind über die Interaktion mit B-Lymphozyten an der Vermittlung der humoralen Immunität beteiligt. Entsprechend ihrer Zytokinsekretion werden  $T_H$ -Zellen in  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_H10$ -Zellen klassifiziert.  $T_H1$ -Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , das die Bildung von IgG2a fördert.  $T_H2$ -Zellen sezernieren IL-4 und begünstigen die Bildung von IgG1 und IgE.  $T_H10$ -Zellen hingegen sezernieren IL-10 und verstärken die Bildung von IgA (Fazilleau *et al.* 2009).

#### 1.3.5 Induzierte regulatorische T-Zellen: $T_R1$ und $T_H3$ -Zellen

Induzierte oder adaptive  $T_{REGS}$  ( $iT_{REGS}$ ) differenzieren in der Peripherie aus naiven  $CD4^+$  T-Zellen (Zheng *et al.* 2004).  $iT_{REGS}$  sammeln sich vorwiegend in inflammatorischen Geweben sowie der Darmschleimhaut an. Sie tragen zur Erhaltung der Toleranz in der

Darmflora bei und vermindern die Abstoßung fremder Gewebe.  $iT_{REGS}$  benötigen nur eine geringe Signalübertragung von kostimulierenden Molekülen (Yuan & Malek 2012).

$iT_{REGS}$  werden abhängig von ihrem Zytokinprofil in die  $T_{REGS}$  des Typ 1 ( $T_{R1}$ ) und die  $T_{H3}$ -Zellen ( $T_H$ -Zellen Typ 3) unterteilt. Die Entwicklung der  $T_{R1}$ -Zellen ist von IL-10 abhängig (Roncarolo *et al.* 2006; Fujio *et al.* 2010). Neben der Sekretion von hohen Dosen an IL-10 und TGF- $\beta$ , sezernieren  $T_{R1}$ -Zellen auch geringe Mengen an IL-2, IL-5 sowie IFN- $\gamma$ . Ein wichtiger Wachstumsfaktor der  $T_{R1}$ -Zellen ist IL-15, der die Proliferation der  $T_{R1}$ -Zellen auch ohne Aktivierung des TCR ermöglicht.  $T_{R1}$ -Zellen sind anerg, exprimieren das Oberflächenmolekül CD4 und proliferieren nach Antigen-spezifischer Aktivierung nur schlecht. Letzteres liegt möglicherweise an der autokrinen Bildung von IL-10, das zu einer Suppression der Proliferation führt. Bisher ist mit Ausnahme des Transkriptionsfaktors GATA-3 kein spezifischer Marker für die  $T_{R1}$ -Zellen bekannt (Roncarolo *et al.* 2006; Fujio *et al.* 2010).  $T_{R1}$ -Zellen exprimieren kein FoxP3 (*forkhead box protein 3*; Battaglia *et al.* 2006).

$T_{H3}$ -Zellen sezernieren TGF- $\beta$  sowie IL-10 und exprimieren FoxP3 (Beissert *et al.* 2006). Sie entwickeln sich in Anwesenheit von TGF- $\beta$  aus naiven  $CD4^+$  T-Zellen. Ihre Funktion liegt in der oralen Toleranz gegenüber Fremd-Antigenen (Wan & Flavell 2007). Infolge der Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  sind  $T_{H3}$ -Zellen zur Suppression fähig. Auch für die  $T_{H3}$ -Zellen ist bisher kein spezifischer Marker identifiziert worden (Korn *et al.* 2009).

## 1.4 Natürliche regulatorische T-Zellen ( $nT_{REGS}$ )

Regulatorische T-Zellen sind eine spezialisierte Subpopulationen der T-Lymphozyten, welche die Aktivierung des Immunsystems inhibieren. So gewährleisten sie die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen und die immunologische Homöostase. Neben den bereits beschriebenen  $iT_{REGS}$  existieren die natürlichen regulatorischen T-Zellen ( $nT_{REGS}$ ). Sie exprimieren neben dem Oberflächenmarker CD4 die  $\alpha$ -Kette des IL2-Rezeptors (CD25), sind anerg und haben eine suppressive Funktion. Aufgrund ihrer Entwicklung im Thymus werden sie als „natürliche“ regulatorische T-Zellen bezeichnet. Eine Depletion von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen führt bei Mäusen zu der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in mehreren Organsystemen (u. a. autoimmunbedingte Thyreoiditis, Gastritis, Diabetes und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen) (Sakaguchi *et al.* 1995).

### 1.4.1 Entwicklung von nT<sub>REGS</sub>

Nur ein geringer Anteil der einfach positiven (*single positive*; SP) CD4<sup>+</sup> Thymozyten, etwa 4 %, entsprechen CD25<sup>+</sup> nT<sub>REGS</sub>. Sie exprimieren neben dem Transkriptionsfaktor FoxP3 die Oberflächenrezeptoren CTLA-4 sowie GITR (*glucocorticoid induced TNF receptor family related gene*) und verfügen bereits über die Funktion, T-Zellen *in vitro* zu inhibieren (Takahashi *et al.* 2000; Shimizu *et al.* 2002; Hori *et al.* 2003). FoxP3 aus der Familie der „forkhead/winged-helix“ Transkriptionsfaktoren gilt als „Master-Regulator“ für die Entwicklung und Funktion der nT<sub>REGS</sub> (Fontenot *et al.* 2003; Hori *et al.* 2003). Mutationen im FoxP3-Gen verursachen beim Menschen eine Autoimmunerkrankung, das sogenannte IPEX-Syndrom (*immune dysregulation polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*). Analog führt eine Mutation im foxp3-Gen der *scurfy* (sf)-Maus dazu, dass diese keine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> entwickelt. Die *scurfy* Maus stirbt drei Wochen postnatal an den Folgen einer Autoimmunerkrankung (Bennet *et al.* 2001; Brunkow *et al.* 2001). FoxP3 positive Thymozyten sind hauptsächlich in der Medulla des Thymus lokalisiert (Ohkura & Sakaguchi 2010). In einem relativ späten Stadium der Thymozytenentwicklung differenzieren sie aus SP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in FoxP3 exprimierende nT<sub>REGS</sub>. Für die Reifung der T<sub>REG</sub>-Vorläuferzellen scheint die MHC-II-vermittelte Selektion wichtig zu sein. Ob Thymozyten in konventionelle oder regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten differenzieren wird von der Avidität des TCR für Selbst-Antigene bestimmt. Bei relativ hoher Affinität für MHC-Selbst-Peptide werden CD25<sup>+</sup> nT<sub>REGS</sub> positiv selektioniert (Yuan & Malek 2012). Sie wandern drei Tage nach ihrer Entwicklung aus dem Thymus in die Peripherie (Asano *et al.* 1996). Werden genetisch susceptible Mäuse am Tag drei p. p. thymektomiert, fehlen T<sub>REGS</sub> in der Peripherie und es kommt zur Autoimmunität.

### 1.4.2 Phänotypische Charakterisierung von nT<sub>REGS</sub>

Der Phänotyp von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> ähnelt dem der aktivierten T<sub>EFF</sub>-Zellen. Beide Zellpopulationen exprimieren konstitutiv gleiche Oberflächenmoleküle sowie aktivierungsassoziierte Moleküle. Jedoch wird die  $\alpha$ -Kette des IL-2R (CD25) auf humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterschiedlich stark exprimiert. Im peripherem Blut exprimieren etwa 30 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD25 schwach (CD25<sup>low</sup>), während nur 1 - 2 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD25 in hohen Mengen (CD25<sup>high</sup>) exprimieren (Baecher-Allan *et al.* 2005). Alle murinen T<sub>REGS</sub>, die den Oberflächenmarker CD25 gering oder stark exprimieren, weisen eine regulatorische Funktion auf. Dagegen zeigen bei humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Subpopulation nur solche mit



einer hohen Expression von CD25 ( $CD4^+CD25^{high}$ ) einen ähnlich starken suppressiven Effekt (Baecher-Allan *et al.* 2001).

$nT_{REGS}$  sind phänotypisch noch immer nicht eindeutig definiert. CD25 wird konstitutiv auf allen  $nT_{REGS}$  exprimiert und als erster bekannter  $T_{REG}$ -Marker für die Isolierung von  $T_{REGS}$  verwendet. CD25 wird jedoch auch von aktivierten  $T_{EFFS}$  transient hochreguliert, so dass isolierte  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen keine reine  $T_{REG}$ -Population repräsentieren. Auch bei der Analyse von Suppressions-Tests kann von einer Kontamination der  $T_{REG}$ -Population durch aktivierte  $T_H$ -Zellen ausgegangen werden (Schmetterer *et al.* 2012).

**Tab. 1: Zellmarker von natürlichen regulatorischen T-Zellen ( $nT_{REGS}$ )**

Molekül	Expression	Kommentar	Referenzen
CD25	konstitutiv	Expression auch auf aktivierten $T_{EFFS}$	Sakaguchi <i>et al.</i> 1995
FoxP3 <sup>a)</sup>	konstitutiv	Transkriptionsfaktor, Expression auch auf aktivierten $T_{EFFS}$	Fontenot <i>et al.</i> 2003; Fontenot <i>et al.</i> 2005; Hori <i>et al.</i> 2003
MHC-II / HLA-DR	konstitutiv	$T_{REGS}$ mit hoher suppressiver Aktivität	Baecher-Allan <i>et al.</i> 2001; Baecher-Allan <i>et al.</i> 2006
CTLA-4, GITR	konstitutiv	Expression auch auf aktivierten $T_{EFFS}$	Takahashi <i>et al.</i> 2000; Mc Hugh <i>et al.</i> 2002
Helios	konstitutiv	Expression ausschließlich auf $nT_{REGS}$	Getnet <i>et al.</i> 2010
CD27	Subpopulation	keine Expression auf aktivierten $T_{REGS}$	Duggleby <i>et al.</i> 2007
CD39, CD73 <sup>b)</sup>	Subpopulation		Borsellino <i>et al.</i> 2007; Deaglio <i>et al.</i> 2007; Dwyer <i>et al.</i> 2007; Mandapathil <i>et al.</i> 2009
CD45RA <sup>b)</sup>	Subpopulation	Expression auf naiven $T_{REGS}$	Hoffmann <i>et al.</i> 2006
CD45RO <sup>b)</sup>	Subpopulation	Gedächtnis-T-Zellen	Hoffmann <i>et al.</i> 2006
CD49d ( $\alpha_4\beta_1$ ) <sup>c)</sup>	Subpopulation	Expression auf aktivierten $T_{EFFS}$	Kleinewietfeld <i>et al.</i> 2009
CD62L / CD44 <sup>f)</sup>	Subpopulation	Expression auf naiven $T_{REGS}$	Peterson <i>et al.</i> 2012
CD127	Subpopulation	keine bis geringe Expression auf $nT_{REGS}$	Liu <i>et al.</i> 2006
CXR4, CCR6, CCR7, CCR9 <sup>e)</sup>	Subpopulation		Kleinewietfeld <i>et al.</i> 2005; Yamazaki <i>et al.</i> 2008; Peterson <i>et al.</i> 2012
GARP	Subpopulation	Expression auch auf aktivierten $T_{EFFS}$	Wang <i>et al.</i> 2008
LAP	Subpopulation	Marker für aktivierte $T_{REGS}$	Chen <i>et al.</i> 2008
LPAM ( $\alpha_4\beta_7$ ) <sup>c)</sup>	Subpopulation	Expression auf naiven $T_{REGS}$	Peterson <i>et al.</i> 2012
PD-1 (CD279) <sup>d)</sup>	Subpopulation	Marker für naive $T_{REGS}$	Raimondi <i>et al.</i> 2006

Bezeichnungen: a) Transkriptionsfaktor; b) Aktivierungsmarker; c) Integrin; d) Apoptose Rezeptor; e) Chemokinrezeptor; f) Adhäsionsmolekül

Der bisher zuverlässigste Marker für die Charakterisierung von  $T_{REGS}$  scheint der Transkriptionsfaktor FoxP3 zu sein. Jedoch zeigen einige  $CD8^+$  T-Zellen und ein geringer Teil der  $CD45RB$  schwach exprimierenden  $CD4^+$  T-Zellen ebenfalls eine FoxP3 Expression (Sakaguchi 2004). Da FoxP3 ein intrazelluläres Protein ist, erfordert die Detektion eine Fixierung und Permeabilisierung der Zelle, so dass eine Isolation von lebenden Zellen für die Anwendung von funktionellen Analysen *in vitro* und *in vivo* nicht möglich ist.

In einer kleinen Subpopulation humaner  $CD4^+$  T-Zellen ist die  $\alpha$ -Kette des IL7-Rezeptors (CD127) herunter reguliert (Liu *et al.* 2006; Seddiki *et al.* 2006). In dieser Subpopulation korrelierte die Expression von CD127 invers mit der Expression von FoxP3. Die reduzierte Expression von CD127 ist möglicherweise auf die Interaktion von FoxP3 mit dem Promoter von CD127 zurückzuführen. Die Mehrzahl der  $CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$  T-Zellen war FoxP3 positiv (86,6 %; Liu *et al.* 2006). Bei einer Kombination der Marker CD25 und CD127 konnten aus  $CD4^+$  T-Zellen  $CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$   $T_{REG}$ -Zellen mit einer Ausbeute von 7 % bis 8 % isoliert werden. Zudem supprimierten  $CD127^{-/low}$   $T_{REGS}$  die Proliferation von alloreaktiven T-Zellen (PBMCs) in funktionellen Assays *in vitro* (Liu *et al.* 2006).

CD39 (Ekonukleotidase Triphosphat Diphosphohydrolase-1) wurde ursprünglich als Aktivierungsmarker von Lymphozyten beschrieben. Es spaltet Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) enzymatisch (Kansas *et al.* 1991; Maliszewski *et al.* 1994). CD39 wird zusammen mit CD73 (Ekto-5'-Nukleotidase) auf  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T-Zellen exprimiert (Borsellino *et al.* 2007; Deaglio *et al.* 2007). Unter Verwendung von CD39 als Marker konnten aus humanem peripheren Blut T-Zellen isoliert werden, die zu mehr als 90 %  $CD4^+FoxP3^+$  waren und eine hohe suppressive Funktion aufwiesen (Mandapathil *et al.* 2009). Widersprüchlich dazu sind experimentelle Daten aus demselben Jahr, da auch *memory* T-Zellen CD39 exprimieren (Zhou *et al.* 2009). CD39 wird in  $CD4^+CD25^{high}$   $T_{REGS}$  hoch exprimiert, während nur 50 % der  $CD4^+CD25^{dim}$  Population CD39 exprimieren. Die Co-Expression von CD39 und CD73 auf  $CD4^+CD25^+$   $T_{REGS}$  unterscheidet sowohl murine als auch humane  $T_{REGS}$  von aktivierten T-Zellen (Dwyer *et al.* 2007).

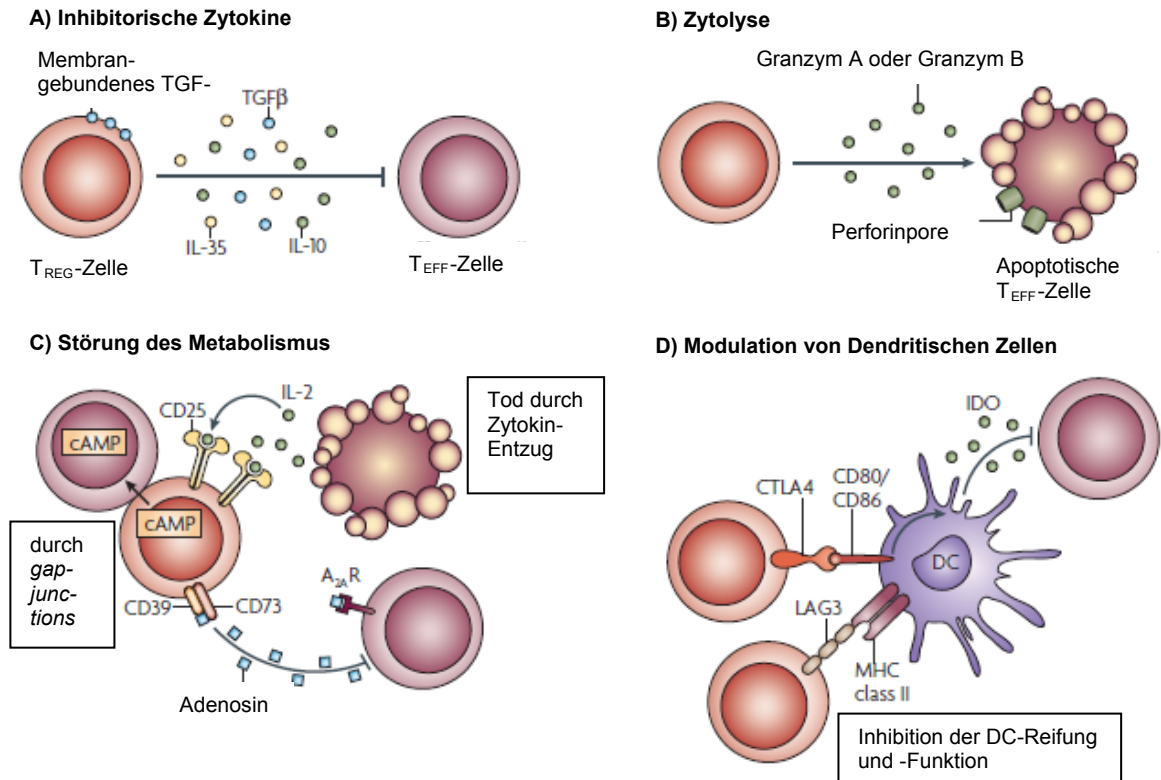
CD49d, die  $\alpha$ -Kette des Integrins VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ), wurde als weiterer Marker für die Isolation von  $nT_{REGS}$  verwendet. Das Integrin wird auf proinflammatorischen  $T_{EFFS}$  exprimiert, ist aber nicht auf immunsuppressiven FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden. Eine Depletion von  $CD49d^+$  T-Zellen trennt IFN- $\gamma$  und IL-17 sezernierende Zellen von  $CD4^+CD25^{high}$  T-Zellen (Kleinewietfeld *et al.* 2009). CD49d in Kombination mit dem Marker CD127 ( $CD127^{-/low}$ ) erlaubt eine Depletion von proinflammatorischen  $CD25^-$   $T_{EFF}$ -Zellen und eine Isolation von hochreinen FoxP3<sup>+</sup>  $T_{REGS}$ , so dass eine positive Selektion mit Antikörpern nicht erforderlich ist. CD49d wird auf mehr als 80 % der humanen PBMCs exprimiert, darunter naive

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> T-Zellen und Zytokin sezernierende CD4<sup>+</sup> T<sub>EFFS</sub> (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17-Zellen) (Kleinewietfeld *et al.* 2009).

Ferner sind folgende Marker für humane nT<sub>REGS</sub> beschrieben worden: die T-Zell-Aktivierungs- bzw. Differenzierungsmarker CD45R0 (aktivierte, *memory* T-Zellen), und CD45RA (naive T-Zellen); die Adhäsionsmoleküle CD62L, CD44 sowie das Integrin  $\alpha_4\beta_7$  (ruhende T-Zellen); CTLA-4, GITR und die Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und CCR9 (Peterson 2012). FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich in die naiven CD45RA positiven und die *memory* CD45R0 positiven T-Zellen klassifizieren. CD45RA ist ein Glykoprotein, das abhängig vom Zelltyp und dem Aktivierungsstatus in verschiedenen Isoformen exprimiert wird (Thomas 1989). Die Isoformen werden mittels alternativem „Spleißen“ der Exons 4, 5 oder 6 erzeugt, die als CD45RA, CD45RB und CD45RC bezeichnet werden. Naive T-Zellen sind CD45RA positiv und exprimieren Isoformen, die das Exon 4 enthalten. Nach Aktivierung der T-Zelle werden nur noch Isoformen exprimiert, die Exon 4 nicht mehr enthalten (CD45RB), während bei *memory* T-Zellen das Spleißen der Exons 4 bis 6 inhibiert wird und die Zellen keine der Isoformen CD45RA, RB, RC aufweisen und als CD45R0 bezeichnet werden (Akbar *et al.* 1988). Etwa 42 % der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Subpopulation sind CD45RA positiv (Hoffmann *et al.* 2006).

### 1.4.3 Suppressionsmechanismen von nT<sub>REGS</sub>

Für die T<sub>REG</sub>-Zellen vermittelte Suppression wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die vorwiegend auf der Analyse von *in vitro* Suppressions-Tests beruhen (Vignali *et al.* 2008). T<sub>REGS</sub> wirken entweder Zell-kontaktabhängig oder kontaktunabhängig über die lokale Sekretion inhibitorischer Zytokine (Abb. 2). Obgleich nT<sub>REGS</sub> eher ein Zell-kontaktabhängiger und iT<sub>REGS</sub> eher ein Zytokin vermittelter Suppressionsmechanismus zugeordnet wird, gibt es Hinweise, dass diese Mechanismen nicht ausschließlich über den ein oder anderen Zelltyp vermittelt werden.



### **Abb. 2: Suppressionsmechanismen von regulatorischen T-Zellen**

Suppression der nT<sub>REGS</sub> infolge von **A)** inhibitorischen Zytokinen, **B)** Zytolyse, **C)** Störung des Metabolismus oder **D)** Modulation von DCs (verändert nach Vignali *et al.* 2008).

Die Zytokin vermittelte Suppression erfolgt über IL-10, TGF- $\beta$  oder IL-35 (Abb. 2A). IL-10 ist seit langem als antiinflammatorisches Zytokin bekannt. TGF- $\beta$  z. B. kann die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-bet oder die Aktivierung von Makrophagen unterdrücken und verhindert so die Entwicklung von inflammatorischen Immunantworten (Vignali *et al.* 2008). T<sub>REGS</sub> können vermehrt sowohl membrangebundenes als auch lösliches TGF- $\beta$  bilden und supprimieren *in vitro* die Proliferation muriner und humaner T<sub>EFFS</sub> (Levings *et al.* 2002; Nakamura *et al.* 2004). Humane T<sub>REGS</sub> exprimieren IL-35 nicht konstitutiv (Bardel *et al.* 2008). Dennoch vermag IL-35 an der Suppression humaner T<sub>EFFS</sub> beteiligt sein, da eine Zufuhr von IL-35 zu naiven T-Zellen eine iT<sub>REGS</sub> Population induziert, die eine Suppression über IL-35 vermittelt (Collison *et al.* 2010).

Eine Zell-kontaktabhängige Suppression von T<sub>EFFS</sub> kann über die Sekretion von Perforin und Granzym erfolgen (Abb. 2B). Humane nT<sub>REGS</sub> exprimieren nach Aktivierung vermehrt Granzym A und induzieren Perforin-abhängig die Apoptose von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie anderer T<sub>EFFS</sub> (Grossman *et al.* 2004). Gondek *et al.* (2005) beschrieben, dass aktivierte

murine  $T_{REGS}$  Granzym B -abhängig die Proliferation von  $T_{EFFS}$  inhibierten. Der Suppressionsmechanismus ist hierbei Perforin-unabhängig.

Störungen des Zellmetabolismus wurden als weitere potentielle Mechanismen der  $T_{REG}$  vermittelten suppressiven Wirkung auf Zielzellen diskutiert (Abb. 2C). Eine der Hypothesen beruht auf der hohen Expression von CD25 auf  $nT_{REGS}$ . So soll die Überexpression von CD25 zur kompetitiven Bindung von exogenem IL-2 führen, wodurch dieses den  $T_{EFFS}$  für die Proliferation und Differenzierung nicht mehr zur Verfügung steht (de la Rosa *et al.* 2004). Der Entzug von IL-2 und anderen Zytokinen soll Apoptose induzieren (Pandiyani *et al.* 2007). Ein vermehrter Anstieg an cAMP war bei supprimierten  $T_{EFFS}$  nach  $T_{REG}$ -Kontakt zu beobachten. Vermutlich wird cAMP intrazellulär von  $T_{REGS}$  über die *gap-junctions* der Zellmembran in die  $T_{EFFS}$  transferiert. Ein erhöhter cAMP-Spiegel inhibiert die IL-2-Bildung und Proliferation von  $T_{EFFS}$  (Bopp *et al.* 2009). Ein weiterer Suppressionsmechanismus von  $T_{REGS}$  ist die Hydrolyse von extrazellulärem ATP in perizelluläres Adenosin durch die Ektoenzyme CD39 und CD73. Adenosin bindet an den Adenosin-Rezeptor 2A auf aktivierten  $T_{EFFS}$  und supprimiert ihre Funktion (Borsellino *et al.* 2007; Mandapathil *et al.* 2010).

Auch über die Regulierung von DCs können  $T_{REGS}$  auf die Aktivierung von  $T_{EFFS}$  eingreifen (Abb. 2D). DCs sind für die optimale Aktivierung von  $T_{EFFS}$  essentiell. Dieser Prozess kann von  $T_{REGS}$  durch ihre Bindung an MHC-Klasse II- und kostimulatorische Moleküle negativ beeinflusst werden. Die Bindung von LAG3 an MHC-Klasse II-Moleküle auf reifen DCs, aktiviert einen inhibitorischen Signalweg, der über ITAMS (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) vermittelt wird. Dadurch wird die Reifung und immunstimulatorische Fähigkeit von DCs gehemmt (Liang *et al.* 2008). CTLA-4 hingegen kann die kostimulatorischen Bindungsstellen CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) besetzen. Die Bindung von CTLA-4 an CD80 und CD86 resultiert in der Expression und Aktivierung von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) (Fallarino *et al.* 2003). IDO ist ein katabolisches Enzym, welches den Abbau von Tryptophan begünstigt. Eine reduzierte Konzentration von Tryptophan im Kulturmedium ist mit einer verminderten Aktivierung von T-Zellen assoziiert (Munn *et al.* 2002; Mellor & Munn 2004).

Es wird vermutet, dass abhängig von der Art der Entzündung und der Lokalisation der zu inhibierenden Zielzelle mehrere Mechanismen simultan wirken (Sojka *et al.* 2008).

### 1.4.4 Regulatorische T-Zellen und Autoimmunerkrankungen

Trotz vieler offener Fragen bezüglich der Funktion und Charakterisierung von  $T_{REGS}$  gibt es keinen Zweifel, dass diese T-Zellen von hoher Relevanz sind für die Erhaltung peripherer Toleranz.  $T_{REGS}$  sind maßgeblich an der Prävention von Autoimmunerkrankungen beteiligt. Eine Beeinträchtigung von  $CD4^+CD25^+$   $T_{REGS}$  könnte zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führen und zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen. Bei einigen Autoimmunerkrankungen des Menschen wurden eine verminderte Frequenz von  $T_{REGS}$ , ein veränderter  $T_{REG}$ -Phänotyp und/oder eine verminderte suppressive Aktivität festgestellt. Im Folgenden werden am Beispiel der Multiplen Sklerose, des Typ-1 Diabetes und der rheumatoiden Arthritis, Autoimmunerkrankungen beschrieben, die mit einer Fehlfunktion von  $T_{REGS}$  einhergehen.

#### 1.4.4.1 Multiple Sklerose (MS)

MS ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems mit unterschiedlichen klinischen Verläufen. Autoreaktive T-Zellen richten sich gegen Bestandteile des Myelins wie z. B. das Myelin-Basische Protein oder das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein. Während im peripheren Blut bei MS-Patienten und gesunden Individuen keine Unterschiede in der Anzahl von  $T_{REGS}$  beobachtet wurden (Viglietta *et al.* 2004; Haas *et al.* 2005; Kumar *et al.* 2006; Venken *et al.* 2008), war jedoch die suppressive Funktion der  $CD4^+CD25^{high}$   $T_{REGS}$  beeinträchtigt. Venken *et al.* (2008) verglichen die funktionelle Aktivität der  $T_{REGS}$  von MS-Patienten in einem frühen Stadium (RRMS) der Erkrankung mit MS-Patienten in einem bereits sekundär progredienten Stadium (SPMS). Die Anzahl der  $nT_{REGS}$  war in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die suppressive Aktivität FACS-sortierter (*fluorescence activated cell sorting*) naiver  $T_{REGS}$  ( $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^+$ ) war sowohl bei RRMS-Patienten als auch SPMS-Patienten funktionell beeinträchtigt. In der Gruppe der SPMS-Patienten war jedoch gegenüber der RRMS-Patienten die Anzahl der *memory*  $T_{REGS}$  ( $mT_{REGS}$ ) ( $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RO^+$ ) erhöht, die zur suppressiven Aktivität fähig waren.

Sowohl  $CD4^+CD25^{high}CD39^+$  als auch  $CD4^+CD25^{high}CD39^-$   $T_{REGS}$  supprimieren die Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion von  $T_{EFFS}$ . Allerdings sind nur  $CD39^+$   $T_{REGS}$  fähig, die Produktion von IL-17 zu supprimieren, während  $CD39^-$   $T_{REGS}$  IL-17 bilden. Eine Analyse von  $T_{REGS}$  bei MS-Patienten zeigte eine normale Anzahl an  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$   $T_{REGS}$ , jedoch war der relative Anteil von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD39^+$   $T_{REGS}$  erniedrigt und die

Suppression beeinträchtigt. CD39<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> scheinen an der Suppression von pathogenen T<sub>H</sub>17-Zellen beteiligt zu sein, so dass eine reduzierte Anzahl der CD39<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> bei MS-Patienten zu einem Kontrollverlust von IL-17 vermittelter autoimmuner Entzündung führen könnte (Fletcher *et al.* 2009).

#### 1.4.4.2 Rheumatoide Arthritis (RA)

RA ist eine chronisch-entzündliche systemische Autoimmunerkrankung, die insbesondere zu einem entzündlichen Prozess der Synovia führt. Im Verlauf der chronischen Entzündung kommt es zur Destruktion von Knorpel und Knochen. Verschiedene Faktoren tragen zu der Manifestation dieser Erkrankung bei. Als antiinflammatorische Biologika werden Antikörper gegen die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 therapeutisch eingesetzt.

Die Funktion von T<sub>REGS</sub> bei der RA ist sowohl im Kollagen-induzierten Arthritis (*collagen-induced arthritis*; CIA) Mausmodell, als auch bei RA-Patienten analysiert worden. Die funktionelle Aktivität der T<sub>REGS</sub> soll beeinträchtigt sein, während die Anzahl der zirkulierenden T<sub>REGS</sub> in RA-Patienten innerhalb der verschiedenen Studien kontrovers diskutiert wird. Einige Arbeiten berichten über eine verminderte Zahl der T<sub>REGS</sub> (Cao *et al.* 2004; Lawson *et al.* 2006; Toubi *et al.* 2005), während andere wiederum keinen Unterschied in der Anzahl der T<sub>REGS</sub> im Vergleich zu gesunden Individuen feststellten (Möttönen *et al.* 2005; Ehrenstein *et al.* 2004). Han *et al.* (2008) postulierten eine Anreicherung von T<sub>REGS</sub> im peripheren Blut der RA-Patienten. Diese Diskrepanz könnte an der phänotypischen Charakterisierung der T<sub>REGS</sub> liegen. Einige Arbeiten definierten T<sub>REGS</sub> als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Mottonen *et al.* 2005), während andere sich auf die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> T<sub>REGS</sub> fokussierten (Cao *et al.* 2004; Ehrenstein *et al.* 2004). T<sub>REGS</sub>, die sich in der entzündeten Synovia ansammeln, exprimieren einen hohen Anteil an CTLA-4 und GITR und tragen den Aktivierungsmarker CD69 (Mottonen *et al.* 2005). T<sub>REGS</sub>, die sich in der synovialen Flüssigkeit der RA-Patienten ansammeln, supprimieren verstärkt die Proliferation von T<sub>EFFS</sub> als auch die Zytokinbildung (TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ) (van Amelsfort *et al.* 2004). Ehrenstein *et al.* (2004) beschrieben, dass zirkulierende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> die Proliferation von T<sub>EFF</sub>-Zellen inhibieren. Allerdings supprimierten sie nicht die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen aktivierter T-Zellen und Monozyten. Eine Behandlung mit anti-TNF- $\alpha$  führte zu einem signifikanten Anstieg in der Anzahl von T<sub>REGS</sub> im peripheren Blut von RA-Patienten, so dass eine Therapie mit anti-TNF- $\alpha$  zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führen kann (Ehrenstein *et al.* 2004). Neuere Arbeiten zur Aufklärung der RA konzentrieren sich

auf ein Gleichgewicht zwischen  $T_{\text{REGS}}$  und anderen proinflammatorischen T-Zellpopulationen wie z. B. den  $T_{\text{H}}17$ -Zellen (Boissier *et al.* 2008).

#### 1.4.4.3 Typ-1-Diabetes (T1D)

T1D ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, in deren Verlauf es zu einer spezifischen Zerstörung der Insulin produzierenden Beta-Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas kommt und damit zum absoluten Insulinmangel. Folglich kommt es zu einem Kontrollverlust des Glukosestoffwechsels, so dass betroffene Personen lebenslang von der externen Insulinzufuhr abhängig sind. In verschiedenen Studien wurde kein Unterschied in der absoluten Anzahl von  $T_{\text{REGS}}$  bei T1D-Patienten und gesunden Probanden beschrieben (Lindley *et al.* 2005; Brusko *et al.* 2007). Allerdings konnten funktionelle Defizite von  $CD4^+CD25^+ T_{\text{REGS}}$  bei T1D-Patienten festgestellt werden. Diese Defizite gingen mit einer reduzierten Bildung von IL-2 und TGF- $\beta$  einher. Putnam *et al.* (2005) widerlegten dieses Ergebnis, indem sie die  $T_{\text{REGS}}$  der T1D-Patienten über Zellsortierung stärker anreicherten und keinen Defekt in der funktionellen Aktivität der  $T_{\text{REGS}}$  feststellten. Lawson *et al.* (2008) postulierten, dass  $CD4^+CD25^{\text{high}} T_{\text{REGS}}$  von T1D-Patienten eine reduzierte Suppression gegenüber autologen  $CD4^+CD25^- T_{\text{EFFS}}$  aufweisen. Ein Unterschied in der Expression von FoxP3 und CD127 der  $CD4^+CD25^{\text{high}} T_{\text{REGS}}$ , der möglicherweise für den Verlust der suppressiven Aktivität verantwortlich sein könnte, wurde aber nicht beobachtet. Cross-over-Assays zeigten eine relative Resistenz der  $CD4^+CD25^{\text{high}} T_{\text{REG}}$ -vermittelten Suppression gegenüber den  $CD4^+CD25^- T_{\text{EFFS}}$  aller getesteten T1D-Patienten (Lawson *et al.* 2008). Eine Abnahme von  $T_{\text{REGS}}$  und / oder eine Zunahme von  $T_{\text{H}}17$ -Zellen induziert möglicherweise eine lokale Entzündung, welche die Entwicklung der T1D beschleunigt. Ein gestörtes Gleichgewicht von  $T_{\text{REGS}}$  und  $T_{\text{H}}17$ -Zellen trägt auch zu einer Progression von mikrovaskulärer Angiopathie bei (Ryba-Stanislawowska *et al.* 2013).

### 1.5 Zielsetzung

Im Kontext der Aufklärung von Autoimmunerkrankungen ist zahlreich über eine verminderte Anzahl und / oder Defekte in der Entwicklung und Funktion von  $T_{\text{REGS}}$  publiziert worden. In einer Studie aus dem eigenen Institut (Kumar *et al.* 2006) zeigte sich, dass  $CD25^{\text{high/intm}} T_{\text{REGS}}$  eine Myelin-basisches Protein (MBP) induzierte Proliferation von  $CD4^+CD25^- T_{\text{EFF}}$ -Zellen bei nur 45 % der MS-Patienten und bei 89 % der gesunden Kon-



trollen supprimierten. Die suppressive Aktivität der  $T_{REGS}$  variierte sehr stark in der Gruppe der MS-Patienten aber auch in der Gruppe gesunder Probanden. Als Ursache kamen am ehesten heterogene  $T_{REG}$ -Zellpopulationen aber auch heterogene  $T_{EFF}$ -Zellpopulationen in Betracht. Diese Hypothese wird gestützt durch z. T. widersprüchliche Befunde vorangegangener und nachfolgender Publikationen bei Patienten *versus* gesunden Probanden (Baecher-Allan *et al.* 2001; Jonuleit *et al.* 2001; Viglietta *et al.* 2004; Baecher-Allan *et al.* 2005; Haas *et al.* 2005; Kumar *et al.* 2006; Liu *et al.* 2006; Seddiki *et al.* 2006; Deaglio *et al.* 2007; Venken *et al.* 2008).

Zu Beginn von meinem Projekt wurden vier Hypothesen zur Analyse von  $nT_{REGS}$  beim Menschen zugrunde gelegt.

1. Unter der Voraussetzung, dass kontaminierende Zellen sich aus der  $nT_{REG}$ -Zellpopulation eliminieren lassen, sollten  $T_{REGS}$  unterschiedlicher Spender gleiche funktionelle Aktivität aufweisen.
2. Die funktionelle Kapazität von  $T_{REGS}$  ist abhängig von ihrem Aktivierungsgrad. In diesem Fall sollte die suppressive Aktivität von  $T_{REGS}$  auf gleicher Zell-zu-Zell Basis, i. e.  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zellen, unterschiedlich sein und zwar in Abhängigkeit des jeweiligen Anteils aktivierter  $T_{REGS}$ .
3. Die funktionelle Kapazität von  $T_{REGS}$  ist abhängig von der Sensitivität der  $CD4^+ T_{EFFS}$  gegenüber suppressiven Mechanismen.
4. Bei der Untersuchung von  $T_{REGS}$  bei Autoimmunerkrankungen ist zu unterscheiden zwischen a) einer verminderten Anzahl von  $T_{REGS}$ , b) dem Aktivierungsstatus von  $T_{REGS}$ , c) der Sensitivität von  $T_{EFFS}$  gegenüber suppressiven Mechanismen und d) der letztendlich kritischen Frage, ob sich etablierte, autoreaktive *memory*  $T_{EFFS}$  supprimieren lassen.

Aus den Hypothesen werden für diese Arbeit die folgenden Ziele abgeleitet:

1. Charakterisierung der  $T_{EFF}$ -Zellpopulation, die von  $T_{REGS}$  effektiv und dosisabhängig supprimiert werden kann.
2. Charakterisierung der suppressiven Kapazität von  $T_{REG}$ -Zell-Subpopulationen.
3. Charakterisierung der suppressiven Kapazität von  $T_{REG}$ -Zell-Subpopulationen gegenüber unterschiedlichen  $T_{EFF}$ -Zell-Subpopulationen.

Aus diesen Zielen ergibt sich das folgende Arbeitsprogramm:

1. Etablierung der Zellseparation mittels MACS und FACS.
2. Etablierung und Optimierung eines *in vitro* Suppressions-Tests.
3. Etablierung von Überkreuz Experimenten (*cross-over*); syngen *versus* allogene.
4. Isolation von T<sub>EFFS</sub> mit unterschiedlichen Aktivierungsmarkern und ihre Analyse im Suppressions-Test.
5. Isolation von CD49d<sup>+</sup>- und CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> und ihre Analyse im Suppressions-Test.
6. Analyse der suppressiven Kapazität von CD49d<sup>+</sup>- und CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> gegenüber unterschiedlichen T<sub>EFFS</sub>.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Blutspender

#### 2.1.1 Blutspender

Zur Gewinnung der regulatorischen T-Zellen und der Effektor-T-Zellen von gesunden, anonymen Spendern wurden *buffy-coats* aus der Blutspendeezentrale des Instituts für Transfusionsmedizin/Universitätsklinikum Essen verwendet. Heparinisiertes humanes Blut wurde von anonymen, gesunden, freiwilligen Donoren gewonnen.

#### 2.1.2 Chemikalien und sonstige Reagenzien

**Tab. 2: Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalie	Hersteller
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Barricydal, Desinfektionsmittel	Interchem Hygiene, Zürich, Schweiz
Biocoll, Trennmedium	Biochrom AG, Berlin
LiChrosolv® Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid, (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Iscove's Flüssigmedium	Biochrom, Berlin
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Nonidet P 40 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
PBS (1x), ohne $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Proteinase K, 30 µg/ml	peqlab, Erlangen
Salzsäure, rauchend (HCl)	Merck, Darmstadt
RPMI 1640, Flüssigmedium	Gibco Life Technologies, Darmstadt
Szintillationsflüssigkeit, „Betaplate Scint for Betaplate“, 5L	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Stain Buffer (mit FBS)	BD Pharmingen, Heidelberg
[methyl-H3]-Thymidin, 185 MBq	Hartmann Analytic, Braunschweig
TRIZMA (Tris)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau in 0,5 % NaCl	Biochrom AG, Berlin

### 2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

**Tab. 3: Medien, Puffer und Lösungen**

Medium/Puffer/Lösung	Zusammensetzung
RPMI 1640 Flüssigmedium mit 25 mM HEPES L-Glutamin	RPMI 1640 substituiert mit : 10 % humanes Serum 100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin 100 mM Glutamin
EDTA, pH 8,0	0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA unter Zugabe von ca. 20 g NaOH- Plättchen in 800 ml dH <sub>2</sub> O lösen, ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
MACS-Puffer	1x PBS substituiert mit: 0,5 % FCS 2 mM EDTA
NaCl (gesättigt)	6 M NaCl in dH <sub>2</sub> O
Tris-HCl, pH 8,5	1 M Tris-HCl, ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
TE-Puffer (1x), pH 8,0	10 mM Tris-HCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
TEN-Puffer (1x), pH 8,0	10 mM Tris-HCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,1 M NaCl

### 2.1.4 Kommerzielle Standardtests (Kits)

**Tab. 4: Standardtests**

Bezeichnung	Hersteller
CD4 <sup>+</sup> T cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
1) Cocktail von Biotin-konjugierten monoklonalen anti-human Antikörpern gegen: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ / δ, CD235a	
2) Anti-Biotin Antikörper konjugiert mit Microbeads	
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Regulatory T cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
3) Cocktail von Biotin-konjugierten monoklonalen anti-human Antikörpern gegen: CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ / δ, CD235a	
4) Anti-Biotin Antikörper konjugiert mit Microbeads	
5) Anti-CD25 Antikörper konjugiert mit Microbeads	

## 2.1.5 Antikörper, Seren und Fluorochrome

### Antikörper für die Durchflusszytometrie

**Tab. 5: Konjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Epitop (anti-human)	Fluorophor / Konjugate	Isotyp	Klon	Hersteller
$\alpha$ CD3	AmCyan	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	SK7	BD Biosciences
$\alpha$ CD25	PE-Cy7	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	2A3	BD Biosciences
$\alpha$ CD27	Alexa Fluor 700	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	M-T271	BD Pharmingen
$\alpha$ CD39	APC	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	MZ18-23C8	Miltenyi Biotec
$\alpha$ CD45RA	V450	Maus IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	HI100	BD Horizon
$\alpha$ CD49d	PE-Cy5	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	9F10	BD Pharmingen
$\alpha$ CD49d	Biotin	Maus IgG <sub>2b</sub>	MZ18-24A9	Miltenyi Biotec
$\alpha$ CD127	Alexa Fluor 647	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	HIL-7R-M21	BD Pharmingen
$\alpha$ CD127	Biotin	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	HIL-7R-M21	BD Pharmingen
$\alpha$ FoxP3	PE	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	259D/C7	BD Pharmingen
$\alpha$ FoxP3	APC	Ratte IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	PCH101	eBioscience
<i>“Human Regulatory T Cell Cocktail”:</i>				BD Pharmingen
$\alpha$ CD4	FITC	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	SK3	
$\alpha$ CD25	PE-Cy7	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	2A3	
$\alpha$ CD127	Alexa Fluor 647	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	HIL-7R-M21	
Isotypkontrolle	FITC	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	MOPC-21	BD Pharmingen
Isotypkontrolle	PE-Cy7	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	MOPC-21	BD Pharmingen
Isotypkontrolle	V450	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	MOPC-21	BD Horizon
Isotypkontrolle	PE-Cy5	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	MOPC-21	BD Pharmingen
Isotypkontrolle	Alexa Fluor 647	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	MOPC-21	BD Phosflow
Isotypkontrolle	PE	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	MOPC-21	BD Pharmingen

## Fluorochrome

**Tab. 6: Charakteristika von Fluorochromen für die Durchflusszytometrie**

Fluorochrom	Abkürzung	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]
Alexa Fluor 647	—	650	668
Alexa Fluor 700	—	696	719
AmCyan ( <i>Anemonia majano</i> )	AmCyan	457	491
Allophycocyanin	APC	650	660
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	494	520
R-Phycoerythrin	PE	496	578
Phycoerythrin-Cyanin 5	PE-Cy5	496	667
Phycoerythrin-Cyanin 5	PE-Cy7	496	785
V450	—	406	450

## Antikörper für die Stimulation humaner T-Zellen

**Tab. 7: Antikörper für die Stimulation humaner T-Zellen**

Epitop (anti-human)	Isotyp	Klon	Hersteller
$\alpha$ CD3	Maus IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	OKT3	eBioscience; Frankfurt
$\alpha$ CD3	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	UCHT1	eBioscience; Frankfurt

## Seren

**Tab. 8: Seren**

Serum	Hersteller
humanes AB Serum, „off the clot“	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
humanes Serum, Serumpool von männlichen Spendern	AG Lindemann, Institut für Transfusionsmedizin, UK Essen
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin

## 2.1.6 Geräte

**Tab. 9: Geräte**

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe	VACUSAFE comfort	Integra Biosciences, Fernwald
Cäsium Gammastrahler	IBL 437c	Cis Diagnostik, Dreieich
CO <sub>2</sub> -Inkubator	HERAcell® 240	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer	FACS Aria I; Software: Diva 6.1.2	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Heizplatte		Rowenta,
MACS Multistand	MiniMACS™ Separator MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mikroskop	AE2000	Motic, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer mit geschliffenem Deckglas		Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
Pipettierhilfe	pipetus®-akku	Hirschmann, Eberstadt
Spektralphotometer	NanoDrop® 1000	peqlab, Erlangen
Sterilbank	MSC-Advantage	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Szintillationszähler	Microbeta® TRILUX	Wallac, Turku, Finnland
Vortexer	7-2020	Neolab, Heidelberg
Waage		Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Certomat WR	B. Braun, Biotech International
Zellernte-Gerät	Tomtec Cell Harvester 96™	Hamden, CT, USA
Vacuum Flask Conversion Kit		
Backfill Container		
Zentrifugen	5810R 5424	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.1.7 Software

**Tab. 10: Software**

Software	Hersteller
BD FacsDiva 6.1.2	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CorelDRAW Graphics Suite X6	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Graphpad Prism 5.0	La Jolla, CA, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmont, USA

## 2.1.8 Verbrauchsmaterial

**Tab. 11: Verbrauchsmaterial**

Artikel	Hersteller
96-well Rundboden-Mikrotiterplatten, mit Deckel	BD Biosciences, San Jose, USA
Einfrierröhrchen, 1,8 ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmalspritzen, 10 ml	BD Plastipak, Madrid, Spanien
Glasfaserfiltermatten A, GF/C, 100/PK	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
MACS Separationssäulen (LS-, MS-Säulen)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Pasteurpipetten aus Glas: ungestopft (150/230 mm) mit Watte gestopft (150/230 mm)	Brand GmbH, Wertheim
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
BD Falcon™ Polystyrol Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
BD Falcon™ Polystyrol Rundbodenröhrchen, 5 ml im Schnappverschluss integriertes Zellsieb	BD Biosciences, San, Jose, CA, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sephadex G-25 M, Säulen	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Probenbeutel für MicroBeta, Membrangröße 90x120 mm	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml), einzeln steril verpackt	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter, Millex-GP (0,22 µm)	Millipore, Tullagreen, Irland
Zellsieb, 30 µm Porengröße	Partec GmbH, Münster
Zentrifugal Filtereinheiten, Amicon® Ultra-4, 10K	Millipore, Tullagreen, Irland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA Isolierung aus Blutproben

Modifizierte Methode (Miller *et al.* 1987)

Zur Isolierung von DNA wurden 5-10 ml Blut in ein 50 ml Röhrchen überführt, auf 50 ml mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und 10 min, bei 3220 x g, 20 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R) zentrifugiert. Im Überstand befand sich das Hämolysat der Erythrozyten, welches verworfen wurde. Das Sediment, welches die Leukozyten enthielt, wurde zur Zelllyse in 30 ml 0,1 % NP-40 (Detergens) resuspendiert und im Anschluss erneut 10 min, 3220 x g bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Sediment zunächst in 1 ml TEN-Puffer (Nukleuslysepuffer) resuspendiert wurde und danach weitere 2 ml TEN-Puffer zugegeben wurden. Nach Zugabe von 200 µl 10 % SDS sowie 100 µl Proteinase K erfolgte zur proteolytischen Spaltung von Proteinen eine Inkubation der Probe bei 55 °C für mindestens zwei Stunden oder alternativ über Nacht. Danach wurde die Probe 15 min auf Eis abgekühlt und 1 ml gesättigte NaCl zur Fällung der Proteine zugefügt. Nach erneuter Zentrifugation von 10 min, 3220 x g bei 4 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5424) wurde die im Überstand befindliche DNA auf 8 ml 100 % Ethanol überführt. Zur Präzipitation der DNA wurde das Gemisch geschwenkt und die präzipitierte DNA mit einer Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml 70 % Ethanol transferiert. Nach einem Waschschrift (5 min, 3220 x g, 20 °C) wurde die DNA getrocknet und in 500 µl TE-Puffer gelöst.

### 2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Konservierung lebender Zellen wurde das Zellsediment im Einfriermedium (50 % RPMI 1640, 40 % Serum, 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Aliquots in Einfrierröhrchen überführt und unter Verwendung eines Styroporgefäßes, welches eine langsame Temperaturabsenkung ermöglicht, umgehend bei - 80 °C eingefroren. Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurde die Zellsuspension sofort in 20 ml Medium überführt und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellsediment ein zweites Mal in Medium resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt, bevor die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen wurden. Auf diese Weise wurde das DMSO aus der Zellsuspension entfernt.

### 2.2.3 Isolierung humaner mononukleärer Zellen

Die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs) erfolgte mittels Dichte-Zentrifugation (Ferrante & Thong 1980; Vissers *et al.* 1988). Hierzu wird ein hydrophiles Polymer mit einem Molekulargewicht von etwa 400.000 Dalton verwendet (Biocoll oder Ficoll). Die Methode beruht auf dem Prinzip der Zelltrennung in einem Medium definierter Dichte von 1,077 g/ml bei RT. Nach der Zentrifugation befinden sich Zellen mit einer geringeren Dichte (Lymphozyten und Monozyten (PBMCs)) in der Interphase zwischen dem Trennmedium und dem Puffer/Plasma. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte aufweisen.

Für die Isolation von PBMCs wurden 15 ml humanes Blut oder der *buffy-coat* gesunder Spender im gleichen Verhältnis mit PBS verdünnt. Die Zellsuspension wurde vorsichtig auf 15 ml Trennlösung (Biocoll) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet und bei 1250 x g, 20 min, 20 °C, Bremse Stufe 3 zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R). Nach der Zentrifugation wurden  $\frac{3}{4}$  des Puffer/Plasma Überstands verworfen und die PBMCs aus der Interphase mit einer sterilen Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Zellen von Plasma, Biocoll und Thrombozyten zu reinigen, wurden diese jeweils 2-mal durch Auffüllen des Röhrchens mit PBS und anschließender Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, 20 °C gewaschen. Danach wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen in PBS resuspendiert.

### 2.2.4 Bestrahlung von Zellen

Als Quelle Antigen-präsentierender Zellen wurden Biocoll isolierte PBMCs aus peripherem Blut oder *buffy-coat* verwendet. Um eine Proliferation der ko-kultivierten Zellen im Suppressions-Test zu verhindern, wurden die Zellen mit einer Cäsium-Quelle (Typ IBL 437C) mit 30 Gy radioaktiv bestrahlt. Die bestrahlten Zellen konnten nicht mehr proliferieren, waren aber zur Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen fähig.

### 2.2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit PBS und anschließend im gleichen Verhältnis mit physiologischer Trypanblaulösung verdünnt. Trypanblau wird auf-

grund der Membrandurchlässigkeit nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen, so dass diese blau gefärbt sind. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde die Zellzahl / ml in vier Großquadraten (16 Einzelquadrate) der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ein Großquadrat mit einer Kammerlänge von 1 mm und einer Kammerhöhe von 0,1 mm entspricht einem Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$ .

$$\text{Mittelwert}_{4\text{Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} / 0,1 \mu\text{l} \times 10^4 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

### 2.2.6 Magnetische Zellsortierung

Die magnetische Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting*; MACS) ermöglicht die Anreicherung von bestimmten Zellen aus einer heterogenen Zellpopulation. Die Selektion erfolgt mittels spezifischer Antikörper an welche superparamagnetische Partikel (*Beads*) gekoppelt sind. Zellen, die den Antikörper gebunden haben, lassen sich mittels Magneten von Zellen trennen, die den Antikörper nicht gebunden haben (Milenyi *et al.* 1990).

Für die Isolation von  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T-Zellen aus humanen PBMCs wurde das „*CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit II*“ der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die Separation von  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten erfolgt über die Depletion von magnetisch-markierten Zellen. Nicht  $\text{CD4}^+$  T-Zellen, wie  $\text{CD8}^+$  T-Zellen,  $\gamma / \delta$ -T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, DCs, Monozyten, Granulozyten und erythroide Zellen werden mit einem Cocktail an Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma/\delta$  und CD235a indirekt markiert. Über einen zweiten anti-Biotin Antikörper (MACS Microbeads, Ø 50 nm) werden diese Zellen magnetisch markiert und verbleiben im Magnetfeld, während die nicht markierten  $\text{CD4}^+$  T-Zellen negativ angereichert (Negativselektion) werden. Die angereicherten  $\text{CD4}^+$  T-Zellen werden mit einem monoklonalen anti-CD25 Antikörper (CD25 Microbeads) magnetisch markiert. Die markierten  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T-Zellen verbleiben in der Separationssäule (Positivselektion), während im Durchfluss die Fraktion der nicht magnetisch-markierten  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  T-Zellen enthalten ist.

Die im Protokoll angegebenen Volumina für die Separation von Zellen mittels magnetischer Markierung beziehen sich auf bis zu  $10^7$  Zellen. Bei höheren Zellzahlen wurden die Volumina entsprechend erhöht. Alle Lösungen wurden bei 4 °C gekühlt gehalten, um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden.

### 2.2.6.1 Negativselektion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die PBMCs wurden bei 300 x g, 4 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R) 10 min zentrifugiert. Die sedimentierten PBMCs wurden in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert und 10 µl des Biotin-konjugierten „CD4<sup>+</sup> T-Zell Biotin-Antikörper Cocktails“ zugefügt. Es folgte eine Inkubation von 10 min, 4 °C in Dunkelheit. Danach wurden 20 µl „Anti-Biotin MicroBeads“ zu der Zellsuspension gegeben und diese weitere 15 min, 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurde nicht gebundener Antikörper durch Waschen mit MACS-Puffer entfernt und das Zellsediment, bei einer Zellzahl von bis zu 10<sup>8</sup> Zellen, in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Die Zellsuspension wird über einen Filter (Ø 30 µm Porengröße) auf eine zuvor mit MACS-Puffer äquilibrierte LS-Säule (1x10<sup>8</sup> magnetisch markierte Zellen pro Säule) gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld (MiniMACS™ Separator) befindet. Nach Passieren der Zellsuspension wurde die Säule 3-mal mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die unmarkierten CD4<sup>+</sup> -T-Zellen passierten die Säule und wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen, während CD4<sup>-</sup> T-Zellen infolge des starken Magnetfelds in der Säule verblieben.

### 2.2.6.2 Positivselektion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Kapitel 2.2.6.1) wurden bei 300 x g, 4 °C zentrifugiert und das Zellsediment in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 10 µl anti-CD25-Antikörper, die mit ferromagnetischen Partikeln gekoppelt sind, zugefügt und die Zellsuspension 15 min bei 4 °C in der Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen mit MACS-Puffer entfernt und das Zellsediment bei einer Zellzahl von bis zu 10<sup>8</sup> Zellen, in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen.

Für die Positivselektion wurde eine MS-Säule (bis zu 10<sup>7</sup> magnetisch markierte Zellen pro Säule) in ein starkes Magnetfeld (MidiMACS™ Separator) platziert und mit MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellsuspension wurde danach auf die Säule gegeben. Die Säule wurde 3-mal mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Der Durchfluss enthielt die unmarkierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen. Anschließend wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit 1 ml MACS-Puffer mithilfe eines Stempels eluiert.

## 2.2.7 Antikörperfärbung

### 2.2.7.1 Zelloberflächenfärbung

Die Zelloberflächen von T-Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und die durchflusszytometrischen Analysen und/oder die fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung am FACS Aria I durchgeführt (Kapitel 2.2.8).

In diesem Protokoll angegebene Volumina beziehen sich auf eine Zellzahl von  $10^6$ . Für andere Zellzahlen wurden die Volumina entsprechend angepasst.

Angereicherte  $CD4^+CD25^+$  sowie  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Kapitel 2.2.6) wurden jeweils in einem Volumen von 100  $\mu$ l „*Stain Buffer*“ aufgenommen und mit 20  $\mu$ l des „*Human Regulatory T Cell Cocktails*“ (Tab. 4) 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. In einigen Experimenten wurden den  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen zusätzlich anti-CD49d und den  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen anti-CD45RA (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) zugefügt. Nach der Inkubationszeit wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen mit 1,5 ml „*Stain Buffer*“ aus dem Färbeansatz entfernt. Die Zentrifugation erfolgte bei 225 x g, 7 min, 20 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R). Das Zellsediment wurde in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und zur fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung eingesetzt.

Für alle durchflusszytometrischen Analysen wurden ungefärbte Zellen und mit Isotyp-Kontrollantikörpern gefärbte Zellen als Kontrollansätze mitgeführt.

Antikörper und Fluorochrome sind in Tabelle 5 und 6 aufgelistet.

## 2.2.8 Durchflusszytometrie

### 2.2.8.1 Allgemeines Prinzip

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) genannt, ermöglicht die Analyse einzelner Zellen in Suspension. Die Zellen können aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften wie Größe und Granularität sowie der Bindung von Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörpern charakterisiert werden. Die Zellen werden für die Analyse mit monoklonalen Antikörpern markiert, an welche direkt ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist oder sie werden über einen sekundären Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörper sichtbar gemacht. Durch hydrodynamische Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrahl passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl. Aufgrund der zellspezifischen

Eigenschaften wird das Licht des Lasers gestreut. Licht, das innerhalb eines geringen Winkels ( $3 - 10^\circ$ ) streut, wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC) bezeichnet und ist proportional zur relativen Größe der Zelle. Das Licht, welches in einem  $90^\circ$  Winkel gestreut wird, wird als Seitwärtsstreulicht (*side scatter*; SSC) bezeichnet und korreliert mit der Granularität der Zelle. Durch die Markierung der Zellen mit fluoreszenz-konjugierten Antikörpern werden die Fluorochrome bei Passieren des Laserlichts angeregt und emittieren Licht in einer für das Fluorochrom charakteristischen Wellenlänge. Dieses wird wiederum von Photodetektoren erkannt und die Signale elektrisch umgewandelt. Das verwendete Analysegerät BD FACSAria I arbeitet mit zwei Signaldetektoren, die unterschiedlich aufgebaut sind. Das Oktagon detektiert das Seitwärtsstreulicht und bis zu 7 Fluoreszenzsignale, die von einem 488 nm (blauen) Laser angeregt werden. Das Trigon detektiert Fluoreszenzsignale, die von einem 633 nm (roten) und 407 nm (violetten) Laser angeregt werden. Jeder Detektor besitzt dichromatische Bandpassfilter, die das emittierte Licht lenken und filtern sowie Signaldetektoren, sogenannte Photoelektronenvervielfacher (*photomultiplier tube*; PMT) und Photodioden. Die Photodiode detektiert das Vorwärtsstreulicht, angeregt durch einen blauen Laser. Die PMTs wiederum detektieren das schwächere Signal, das vom Seitwärtsstreulicht und allen Fluoreszenzkanälen angeregt wird.

Im Analysegerät wird ein fluides System verwendet, das den Transport von definierten Einzelzellen aus der Zellsuspension bis in das Sammelgefäß gewährleistet. Beim Sortiervorgang erzeugt der hydrodynamische Druck einen Flüssigkeitsstrahl, der durch eine Düse ( $130\text{ }\mu\text{m}$ ) geleitet und dort infolge periodischer Druckschwankungen in einzelne Flüssigkeitstropfen gebrochen wird. Der Flüssigkeitsstrahl wird durch die Sortierelektronik im Augenblick des Abreißens entsprechend der festgelegten Sortierkriterien positiv oder negativ aufgeladen. In der nachfolgenden Fallstrecke werden die Tropfen, welche die gewünschten Zellen enthalten, beim Passieren des elektrischen Feldes eines Plattenkondensators entsprechend ihrer Polarität und damit der Farbe der Fluoreszenz elektrostatisch nach rechts oder links abgelenkt und können getrennt aufgefangen werden. Ein Tropfen entspricht dabei einer Zelle. Tropfen, die keine Ladung tragen (unmarkierte Zellen) passieren ungehindert das elektrische Feld und werden verworfen.

### 2.2.8.2 Durchflusszytometrische Analysen

Die Software des Durchflusszytometers (Tab. 10) ermöglicht die Darstellung der gemessenen Parameter als eindimensionales Histogramm (Anzahl gegen Parameter) oder als

eine zweidimensionale Punktwolkendarstellung in einem Graphen (*dot-plot*). Auf jeder Achse wird ein anderer Parameter (FSC, SSC oder ein Fluoreszenzsignal) dargestellt. In der *dot-plot* Darstellung wird jede Zelle entsprechend ihrer Signalintensität für Parameter 1 (x-Achse) und Parameter 2 (y-Achse) zwischen x- und y-Achse als Punkt eingetragen. Durch das Setzen von Analysefenstern (*gates*) in der *dot-plot*-Darstellung können Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Eigenschaften für die Zellanalyse oder -sortierung ausgewählt und einzelne Subpopulationen aus einem heterogenen Zellgemisch gezielt isoliert werden.

### 2.2.8.3 Durchflusszytometrische Zellsortierung

Zur durchflusszytometrischen Sortierung von T-Zellen wurde eine 130 µm *Nozzle* eingesetzt. Diese *Nozzle* wurde nicht entsprechend der Größe von Lymphozyten (70 µm *Nozzle*) verwendet, da der BD FACSAria I für die üblichen Sortiervorgänge im Institut auf eine 130 µm Düse eingestellt war. Es wurde bei einer Frequenz von 14 kHz sortiert (Tab. 12). Als Trägerflüssigkeit wurde steriles PBS eingesetzt. Alle mit den entsprechenden Antikörpern gefärbten Zellsuspensionen wurden zur Entfernung von Zellaggregaten vor der Messung durch ein steriles Zellsieb (35 µm Porengröße; BD Biosciences) filtriert und während der Sortierung in einem Rundbodenröhrchen aufgefangen, in welchem 0,5 bis 1 ml Medium (10 % humanes Serum in RPMI 1640) vorgelegt waren. Das Röhrchen wurde vor dem Sortiervorgang mit dem Medium benetzt, um ein Haften einzelner Zellen am Röhrchenrand zu vermeiden. Die einzelnen Zellsuspensionen waren zuvor über MACS auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sowie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen angereichert (Kapitel 2.2.6). Nach dem Sortiervorgang wurden 1.000 oder 10.000 Zellen der jeweiligen sortierten Zellpopulation hinsichtlich ihrer Reinheit (Re-Analyse) überprüft. Hierbei wurden dieselben Analysefenster wie beim Sortiervorgang gewählt, so dass die Reinheit hinsichtlich der Anzahl an Events (Anzahl an Zellen im *gate*) nach Ausschluss des Zelldebris im Sortierungsfenster berechnet wurde. Die Reinheit der sortierten Zellfraktionen lag in der Regel bei über 97 %. Nach der Re-Analyse folgte eine Zentrifugation für 10 min, 300 x g, 4 °C, der Überstand wurde verworfen und die Zellen entsprechend ihrer Zellkonzentration für den Suppressions-Test (Kapitel 2.2.9) in Medium resuspendiert.

Die Daten der Zellsortierung wurden mit der *Software* Diva 6.1.2 (BD Biosciences) gespeichert und ausgewertet.

**Tab. 12:** Geräteeinstellungen des Durchflusszytometers Aria I

Parameter	Justierung
Nozzle-Öffnung	130 $\mu\text{m}$
Flussrate (Zellen/ sec)	500 - 3000
Probenflüssigkeitsdruck (psi)	10
Transducer-Frequenz (kHz)	14
Amplitude	12-14
Gap	14
Drop-Delay	18,75

## 2.2.9 *In vitro* Analyse von humanen regulatorischen T-Zellen

### 2.2.9.1 Suppressions-Test *in vitro*

Zum Nachweis der funktionellen Aktivität von CD25<sup>+</sup> und CD25<sup>high</sup> T<sub>REG</sub>-Subpopulationen wurde der *in vitro* Suppressions-Test angewandt. Entscheidend hierfür ist die Fähigkeit von T<sub>REGS</sub> nach Aktivierung eine anti-CD3 stimulierte Effektor-T-Zell Proliferation zu inhibieren. Über MACS oder FACS isolierte T<sub>REG</sub>- und T<sub>EFF</sub>-Zellpopulationen aus humanen PBMCs wurden in 96-Loch Rundbodenplatten in 200  $\mu\text{l}$  Kulturmedium in Anwesenheit von  $1 \times 10^5$  bestrahlten autologen PBMCs polyklonal mit anti-CD3 Antikörpern (0,5  $\mu\text{g/ml}$  OKT3) stimuliert. Zur Überprüfung der Suppressionseigenschaften von T<sub>REGS</sub> erfolgte ihre Zugabe zu den Effektorzellen im Verhältnis von 1:1, 1:0,5, 1:0,25 und 1:0,125 (T<sub>EFF</sub> : T<sub>REG</sub>; Tab. 13). Die Proliferation der Effektorzellen (maximale Proliferation) erfolgte in Abwesenheit von T<sub>REGS</sub>. Die Eigenproliferation der T<sub>REGS</sub> wurde in Abwesenheit von Effektorzellen bestimmt. (1:0, 0:1; T<sub>EFF</sub> : T<sub>REG</sub>). Für jeden Suppressions-Test wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach 72 Stunden *in vitro* Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank erfolgte die Zugabe von 1  $\mu\text{Ci}$  <sup>3</sup>[H]-Thymidin (1:10 Verdünnung in RPMI 1640). Die <sup>3</sup>[H]-Thymidin Inkorporation in die DNA wurde als Maß der Zellproliferation nach weiteren 16 Stunden Kultivierung gemessen.



**Tab. 13:** Anzahl der Zellen im Suppressions-Test für 16.000 oder 50.000 Zellen / Test

Anzahl APCs/ Test	16.000 T <sub>EFFS</sub> Anzahl T <sub>REGS</sub>	50.000 T <sub>EFFS</sub> Anzahl T <sub>REGS</sub>	Ratio T <sub>EFFS</sub> /T <sub>REGS</sub>
1 x 10 <sup>5</sup>	1,6 x 10 <sup>4</sup> T <sub>REGS</sub>	5 x 10 <sup>4</sup> T <sub>REGS</sub>	0:1
1 x 10 <sup>5</sup>	1,6 x 10 <sup>4</sup> T <sub>EFFS</sub>	5 x 10 <sup>4</sup> T <sub>EFFS</sub>	1:0
1 x 10 <sup>5</sup>	1,6 x 10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	1:1
1 x 10 <sup>5</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup>	1:0,5
1 x 10 <sup>5</sup>	4 x 10 <sup>3</sup>	1,25 x 10 <sup>4</sup>	1:0,25
1 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>3</sup>	0,6 x 10 <sup>4</sup>	1:0,125

### 2.2.9.2 Messung der Zellproliferation mittels Einbau von radioaktivem Thymidin

Die Methode beruht auf dem Prinzip der Inkorporation radioaktiv markiertem Thymidin während der DNA-Synthese. Bei jeder Zellteilung wird die DNA verdoppelt und hierbei die mit radioaktivem Wasserstoff markierte Nukleinsäure Thymidin eingebaut. Je häufiger sich eine Zelle teilt, desto mehr radioaktiv markiertes Thymidin wird gemessen.

Nach der definierten Markierungszeit von 16 Stunden wurden die T-Zellen durch Zugabe von dH<sub>2</sub>O lysiert. Mithilfe eines Zellerntegerätes (CellHarvester; Tomtec) wurden die markierten Nuklei auf Glasfasermatten transferiert, während nicht in die DNA inkorporiertes Tritium mittels Pumpe abgesaugt wurde. Die Glasfasermatten wurden auf einer Heizplatte getrocknet und in eine MicroBeta-Plastiktasche überführt. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die Plastiktasche zugeschweißt und die Szintillationsflüssigkeit mittels eines Rollers auf der Fasermatte verteilt. Die  $\beta$ -Strahlung des Tritiums wurde im Szintillationsgerät (Wallac) quantifiziert. Hierbei wurde die eingebaute Tritiummenge als Zählimpuls pro Minute (*counts per minute*; cpm) gemessen.

### 2.2.10 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm Microsoft Excel XP und der Prism Software Version 5.0 (Tab. 10) durchgeführt. Zunächst wurde von Doppelbestimmungen das arithmetische Mittel der Zell-Proliferation (in cpm) ermittelt. Nach Abzug der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation bestrahlter ko-kultivierter Zellen (in cpm) wurde die Suppression der T<sub>REGS</sub> mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Suppression in [\%]} = [1 - (\text{Proliferation} \frac{(T_{REGS} - *T_{REGS})}{(*T_{EFFS} - *T_{REGS})})] \times 100$$

$T_{REGS}$  = Proliferation von  $T_{EFFS}$  in Gegenwart von  $T_{REGS}$

$*T_{REG}$  = Eigenproliferation

$*T_{EFFS}$  = Proliferation in Abwesenheit von  $T_{REGS}$  (maximale Proliferation = 100 %)

Die Graphen wurden, sofern nicht anders erwähnt, mit der Prism Software erstellt. Signifikanzniveaus wurden mit dem t-Test ermittelt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  ( $***p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ) wurde als signifikant erachtet.

### 3 Ergebnisse

Die bisher am häufigsten beschriebenen phänotypischen Charakteristika humaner natürlicher  $CD4^+ T_{REGS}$  mit regulatorischem Potential sind das Oberflächenmolekül CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL2R) und der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3. Eine eindeutige Differenzierung der  $CD4^+CD25^+FoxP3^+ nT_{REGS}$  von anderen T-Zellen ist aber nicht möglich, da CD25 oder FoxP3 auch von aktivierten  $T_{EFFS}$  schwach exprimiert wird. Um eine homogene Population von  $T_{REGS}$  zu erhalten, wurden mit der Kombination von verschiedenen Oberflächenmarkern andere Isolationsstrategien für  $T_{REGS}$  entwickelt. Anhand der Expression von CD25 auf humanen  $CD4^+$  T-Zellen wurden zunächst Populationen definiert, die CD25 nur schwach ( $CD25^{low}$ ) exprimieren und Zellen, die CD25 stark ( $CD25^{high}$ ) exprimieren. Letztere entsprechen phänotypisch den humanen  $nT_{REGS}$ . Die Expression von CD25 auf humanen  $CD4^+$  PBMCs variiert von „nicht exprimiert – gering exprimiert – mittelstark exprimiert“ sowie „stark exprimiert“, im Weiteren abgekürzt als  $CD25^-$ ,  $CD25^{-/low}$ ,  $CD25^{intm}$  und  $CD25^{high}$ . Eine Isolierung über die Expressionsmenge ist nur über fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) möglich. Die Effektorzellen sind phänotypisch als  $CD4^+$  oder  $CD4^+CD25^-FoxP3^-$  definiert. Die Isolation der  $T_{REG-}$  als auch der  $T_{EFF-}$ -Zellen erfolgte mit einer Kombination aus magnetischer Separation (MACS) und durchflusszytometrischer Zellsortierung (FACS).

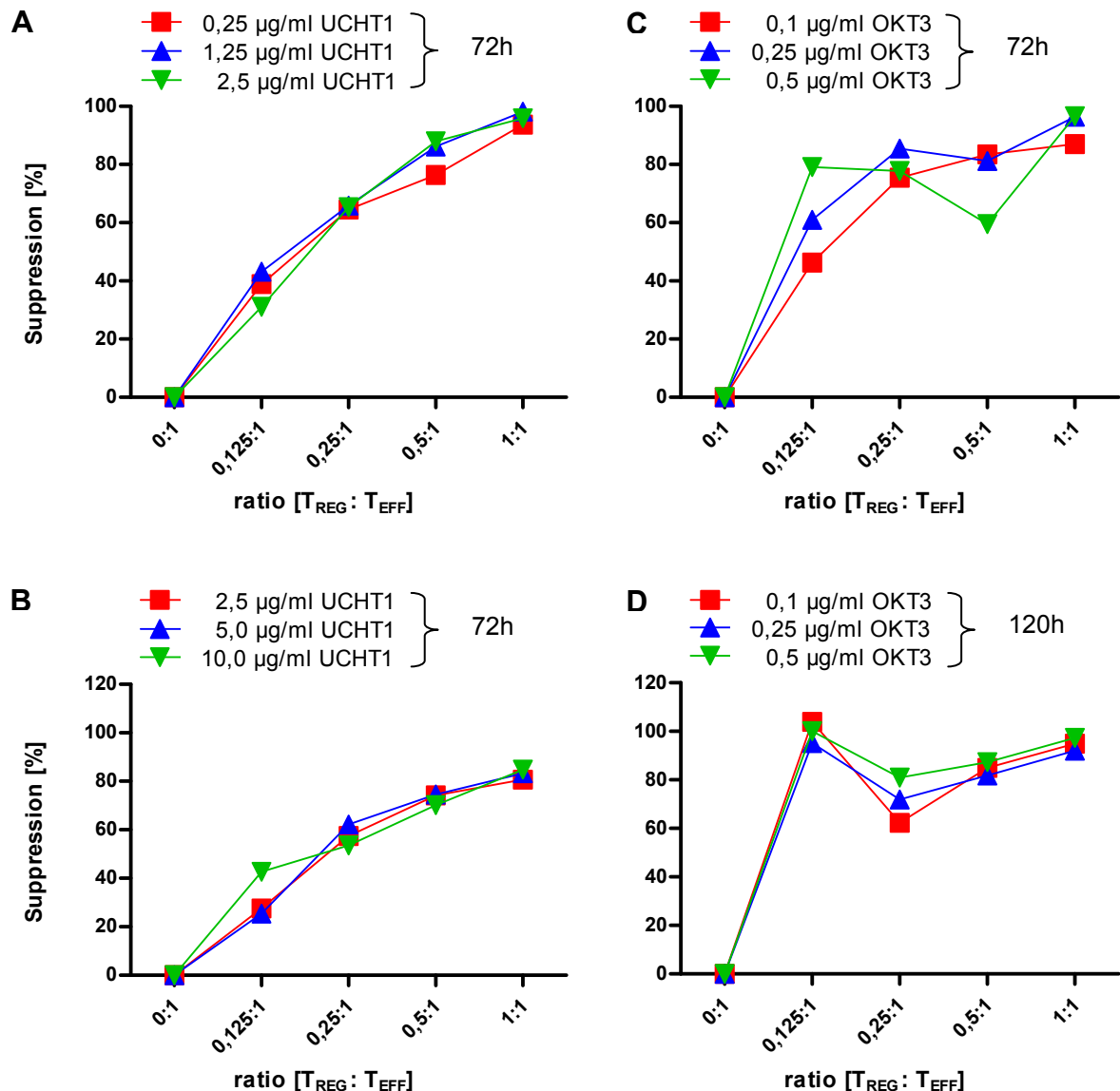
#### 3.1 Analyse von MACS-isolierten $nT_{REG-}$ und $T_{EFF-}$ -Zellen

Unter Verwendung des „*Regulatory T Cell Isolation Kits II*“ (Kapitel 2.2.6) erfolgte die Anreicherung von  $CD4^+$  T-Zellen mittels Negativselektion über MACS. Anschließend wurden die  $CD4^+$  T-Zellen ebenfalls mittels MACS positiv selektioniert für  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen ( $T_{REGS}$ ) und negativ selektioniert für  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen ( $T_{EFFS}$ ). Für die Isolation von  $T_{REG-}$  und  $T_{EFF-}$ -Zellen wurden im Durchschnitt etwa  $3,0 - 5,0 \times 10^8$  mononukleäre Zellen eines *buffy-coats* für die magnetische Separation eingesetzt. Die Ausbeute der  $CD4^+$  T-Zellen nach der MACS-Isolation betrug im Mittel 36,0 %. Bei den negativ isolierten  $CD4^+$  T-Zellen betrug die Ausbeute der  $CD25^+ T_{REGS}$  im Mittel 4,9 %, die Ausbeute der  $CD25^- T_{EFFS}$  73,3 %.

### 3.1.1 Optimierung des *in vitro* Suppressions-Tests

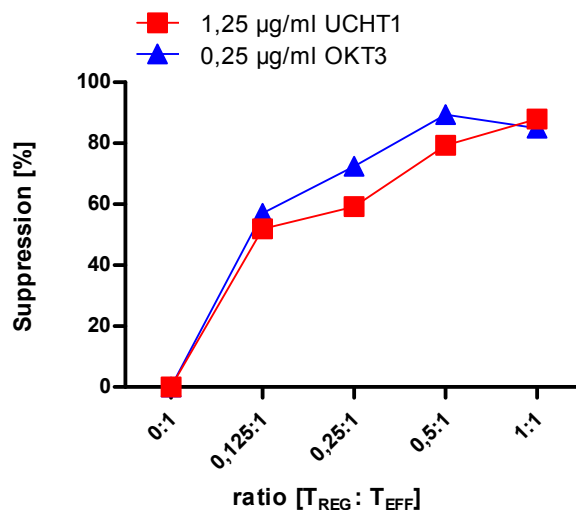
MACS isolierte  $CD4^+CD25^+$   $T_{REGS}$  und  $CD4^+CD25^-$   $T_{EFFS}$  wurden in Gegenwart von bestrahlten (30 Gy) PBMCs und anti-CD3 Antikörpern ko-kultiviert und die Proliferation über den Einbau von  $^3[H]$ -Thymidin bestimmt. Die  $T_{REGS}$  wurden in den Verhältnissen  $[T_{REG} : T_{EFF}]$  0,125:1; 0,25:1; 0,5:1 sowie 1:1 zu einer konstanten Anzahl von  $T_{EFF}$ -Zellen zugefügt. Die PBMCs dienten der Immobilisation von anti-CD3 Antikörpern über Fc-Rezeptoren und der Bereitstellung ko-stimulatorischer Signale. Zunächst wurde die dosisabhängige Stimulation der beiden anti-CD3 Antikörper Klone *UCHT1* und *OKT3* bestimmt. Der Antikörper *UCHT1* wurde in den Konzentrationen von 0,25 µg/ml bis 2,5 µg/ml sowie 2,5 µg/ml bis 10 µg/ml getestet und die Stimulation nach 72 Stunden gemessen. Der *OKT3* Antikörper wurde in den Konzentrationen 0,1 µg/ml bis 0,5 µg/ml getestet. Die T-Zellen wurden mit dem Antikörper *UCHT1* 72 Stunden und mit dem Antikörper *OKT3* sowohl 72 als auch 120 Stunden stimuliert. Die Proliferation wurde über den Einbau von  $^3[H]$ -Thymidin in die DNA der Zellen nach einer weiteren Kultivierung von 16 Stunden als „counts per minute“ (cpm) gemessen (Abb. 3). Als Kontrollen wurden die Proliferationsraten der bestrahlten PBMCs, der  $T_{REGS}$  mit PBMCs sowie der  $T_{EFFS}$  mit PBMCs, jeweils mit anti-CD3 stimuliert und unstimuliert, bestimmt. Die Proliferation der  $T_{REGS}$ , der  $T_{EFFS}$  sowie der PBMCs wurde in die Berechnung der Stimulation bzw. Suppression einbezogen.

Abbildung 3 zeigt, dass die Konzentrationen von 1,25 µg/ml *UCHT1* sowie 0,25 µg/ml *OKT3* gute Proliferations- und Suppressionsraten ergeben und dass eine Messung der Suppression nach 72 Stunden eine sehr viel bessere Dosisabhängigkeit der  $T_{REGS}$  zeigte als nach 120 Stunden. Ein repräsentatives Ergebnis beider Antikörper im Vergleich bei optimaler Antikörper-Konzentration und einer Kulturdauer von 72 Stunden ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 3:** Vergleich der beiden anti-CD3 AK Klone UCHT1 und OKT3 für eine polyklonale Stimulation von humanen T<sub>EFF</sub>-Zellen im Suppressions-Test

Mittels MACS isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> wurden in unterschiedlicher Anzahl mit 5x10<sup>4</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub> und 1x10<sup>5</sup> bestrahlten PBMCs ko-kultiviert. **A)** Zur Stimulation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub> wurde der α-CD3 Klon UCHT1 in den Konzentrationen 0,25, 1,25 und 2,5 µg/ml eingesetzt und die T-Zellen 72 h kultiviert. **B)** Suppressions-Test wie in A) Stimulation mit 2,5, 5,0 und 10,0 µg/ml α-CD3 Klon UCHT1 für 72 h. **C)** Stimulation mit 0,1, 0,25 und 0,5 µg/ml α-CD3 Klon OKT3 für 72 h. **D)** Stimulation mit 0,1, 0,25 und 0,5 µg/ml α-CD3 Klon OKT3 für 120 h. X-Achse: Verhältnis T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> in %.



**Abb. 4: Polyklonale Stimulation mit anti-CD3 AK: Klon UCHT1 oder OKT3 im Vergleich**

MACS isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> wurden in zunehmender Zahl in Gegenwart von 4x10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub> und 1x10<sup>5</sup> bestrahlten PBMCs für 72 h mit 1,25 µg/ml UCHT1 oder 0,25 µg/ml OKT3 polyklonal stimuliert. X-Achse: Verhältnis T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Zellen, Y-Achse: Suppressiv Aktivität der T<sub>REGS</sub> in %.

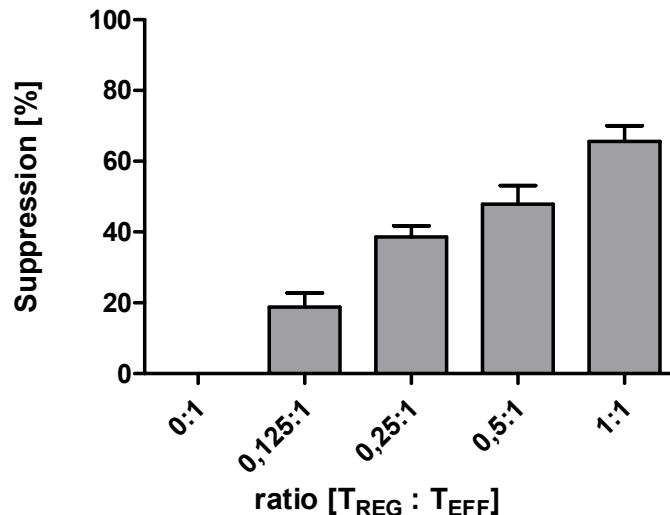
Jeder weitere Suppressions-Test wurde, soweit nicht anders angegeben, unter den folgenden Standardbedingungen durchgeführt: T<sub>REG</sub>-Zellen wurden in den [T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub>] Verhältnissen 0,125:1; 0,25:1; 0,5:1 und 1:1 zusammen mit 5x10<sup>4</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen und 1x10<sup>5</sup> bestrahlten (30 Gy) PBMCs für 72 Stunden ko-kultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde polyklonal mit 0,25 µg/ml α-CD3 (OKT3) induziert. Die Proliferationsrate wurde nach Zugabe von <sup>3</sup>[H]-Thymidin und einer weiteren Kultivierung für 16 Stunden durch den Einbau <sup>3</sup>[H]-Thymidin bestimmt.

### 3.1.2 Funktionelle Analyse syngener versus allogener CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub>

#### 3.1.2.1 Suppressive Aktivität syngener CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen

Zur Feststellung der suppressiven Aktivität wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen im *in vitro* Suppressions-Test mit autologen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen und PBMCs kultiviert. Es wurden acht unabhängige Experimente durchgeführt.

Abbildung 5 zeigt, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> die Fähigkeit besitzen, die Proliferation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub> zu inhibieren. Die Zugabe von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> suppressierte dosisabhängig die Proliferation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub>. Bei einem Verhältnis von 1:1 war mit 66 % (± 4,4 %) die stärkste suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> zu beobachten. Mit abnehmender Anzahl an T<sub>REGS</sub> reduzierte sich die suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> von 48 % (± 5,2 %) auf 39 % (± 3,1 %) und 19 % (± 4,0 %; Abb. 5).



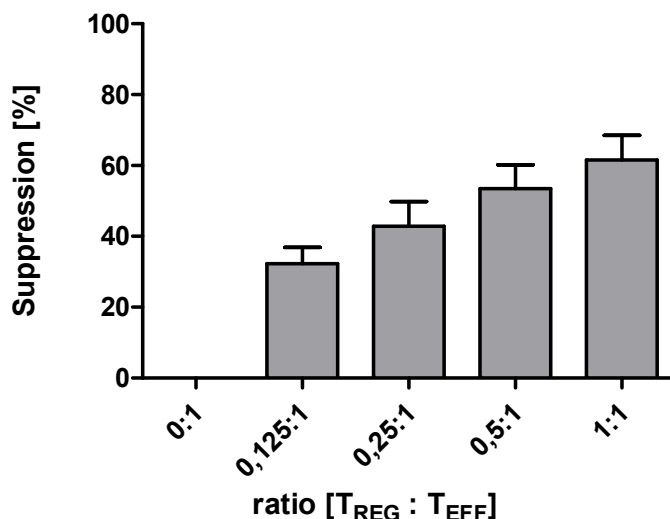
**Abb. 5: Suppressive Aktivität von syngen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen**

Das Histogramm des *in vitro* Suppressions-Tests zeigt die Inhibition der Proliferation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> MACS isolierten T<sub>EFFS</sub>. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus acht unabhängigen Experimenten. X-Achse: Verhältnis T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> in %.

### 3.1.2.2 Suppressive Aktivität allogener CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen

Um festzustellen, ob T<sub>REG</sub>-Zellen in *cross-over* Experimenten ein ähnliches suppressives Potential aufweisen wie in einem syngen Testsystem, wurden allogene T<sub>REG</sub>-Zellen in einem *in vitro* Suppressions-Test analysiert. Dazu wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen sowie bestrahlte PBMCs eines Spenders (syngen zueinander) zusammen mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen eines anderen Spenders (allogen zueinander) in verschiedenen Verhältnissen kulturell. Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnten allogene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen die Proliferation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen dosisabhängig supprimieren. Mit zunehmender Zahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> zu den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub> erhöhte sich die suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> von 32 % (± 7,0 %) über 43 % (± 6,8 %) und 53 % (± 6,8 %) bis auf 62 % (± 4,6 %).

Allogene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> weisen im Vergleich zu syngen T<sub>REGS</sub> bei einem [T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub>] Verhältnis von 1:1 ein ähnlich hohes suppressives Potential auf. Mit abnehmender Zahl an T<sub>REGS</sub> in der Ko-Kultur ließ sich eine reproduzierbar stärkere suppressive Aktivität der allo genen T<sub>REGS</sub> im Vergleich zu syngen T<sub>REGS</sub> beobachten, die bei einem [T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub>] Verhältnis von 0,125:1 mit 32 % *versus* 19 % nahezu doppelt so hoch war.



**Abb. 6: Suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^+$   $T_{REG}$ -Zellen**

Die  $T_{EFF}$ s und PBMCs sind aus dem *buffy-coat* eines Spenders isoliert und syngen zueinander, die  $T_{REG}$ s sind allogene. Das Histogramm repräsentiert Mittelwerte und Standardfehler von neun unabhängigen Experimenten. X-Achse: Verhältnis  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der  $T_{REG}$ s in %.

**Tab. 14: Klinische Daten der gesunden Spender**

Spender-paare	Alter	Geschlecht	HLA-DRB1 Typisierung
1A	54	M	* <b>01:01:01</b> /*03:01:01G
1B	37	M	* <b>01:01:01</b> /*07:01:01G
4A	48	F	*13:01:01G/* <b>15:01:01G</b>
4B	62	F	*11:01:01G/* <b>15:01:01G</b>
6A	31	F	*04:01:01/*13:01:01G
6B	20	F	*01:01:01/—
2A	29	M	*11:04:01/*15:01:01G
2B	50	F	*04:08:01/*13:02:01
7A	53	M	*01:01:01/* <b>15:01:01G</b>
7B	22	F	*07:01:01G/* <b>15:01:01G</b>
8A	25	M	*13:02:01/*16:01:01
8B	25	F	*12:01:01G/*13:02:01

Zur Verifizierung das  $T_{REG}$  und  $T_{EFF}$  zueinander allogene sind, wurden die Spender für das MHC-Klasse II-Molekül HLA-DRB1 genotypisiert. Jedes  $T_{REG}$  (A) und  $T_{EFF}$  (B) Spenderpaar war mindestens in einem der beiden HLA-DRB1 Allele different. Identische HLA-Allele von Spenderpaaren sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die suppressive Aktivität

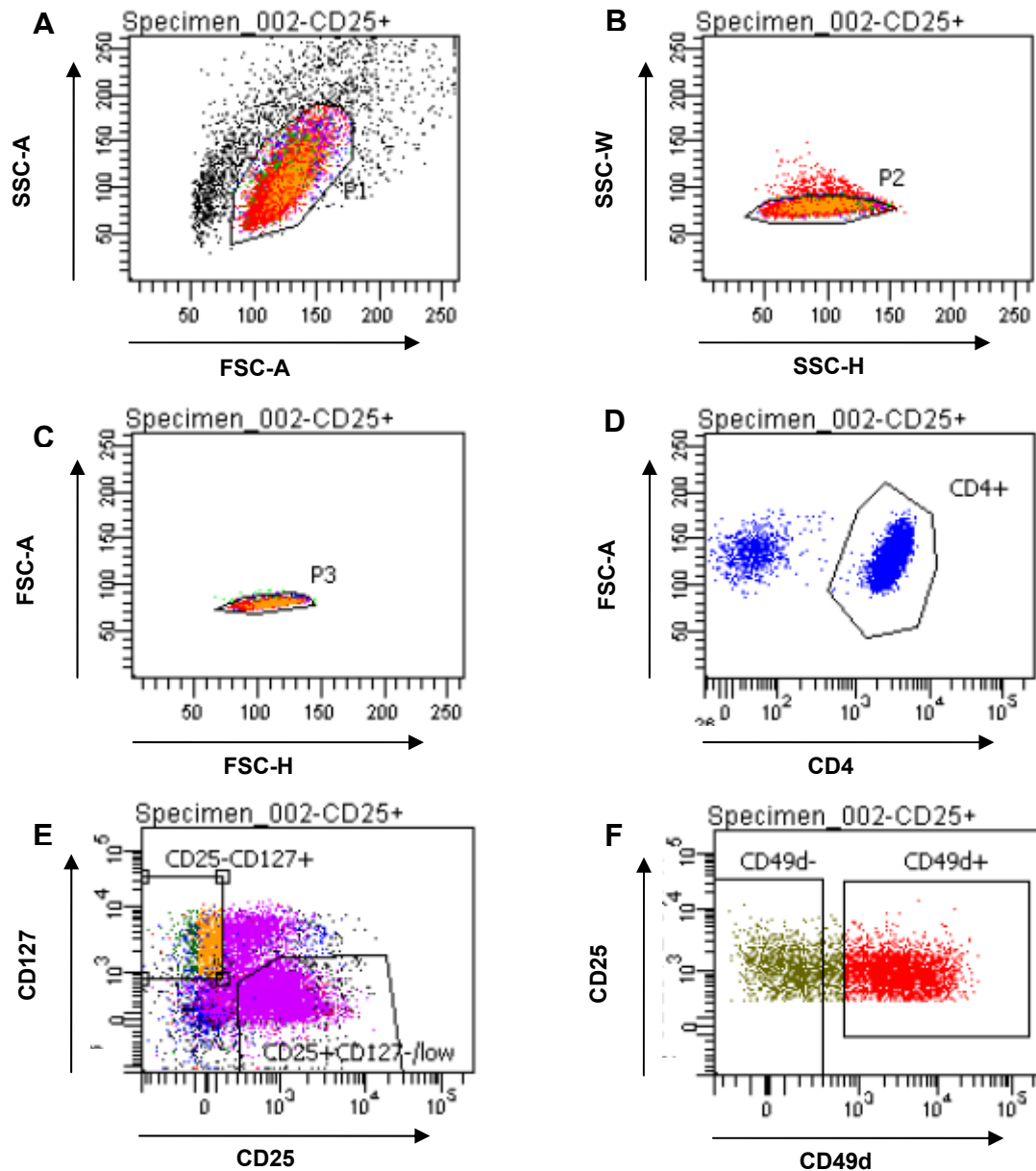


der allogenen  $CD4^+CD25^+$   $T_{REG}$ -Zellen war unabhängig vom Alter, Geschlecht und HLA-Typ des Spenders (Tab. 14).

### 3.2 Durchflusszytometrische Analyse von $T_{REG}$ - und $T_{EFF}$ -Zellen

Die Trennung von Subpopulation innerhalb  $CD4^+CD25^+$  und  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen wurde mittels FACS durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit dem „*Human Regulatory T Cell Cocktail*“ gefärbt (Kapitel 2.2.6). Der Cocktail enthält Antikörper gegen CD4, CD25 und CD127. Die  $CD4^+CD25^+$   $T_{REGS}$  wurden in einigen Experimenten zusätzlich mit CD49d, einem weiteren phänotypischen Marker, gefärbt. Die  $CD4^+CD25^-$   $T_{EFFS}$  wurden zusätzlich zum Cocktail mit CD45RA gefärbt. Die gefärbten T-Zellen wurden mit dem BD FACS Aria I zunächst durchflusszytometrisch analysiert und für die anschließende funktionelle Charakterisierung in die entsprechenden Subpopulationen sortiert. Die funktionelle Aktivität von  $T_{REGS}$  wurde in einem *in vitro* Suppressions-Test bestimmt.

Dazu wurden die Lymphozyten im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) gemessen und als FSC-Plots gegen SSC-Plots dargestellt (Abb. 7 A). Die Lymphozyten wurden mit einem Analysefenster (*gate*) markiert, welches als „P1“ bezeichnet ist. Der Ausschluss von Dubletten erfolgte über die Darstellung von SSC-W gegen SSC-H-Plots sowie FSC-A gegen FSC-H-Plots (Abb. 7 B und C) und ist mit den Analysefenstern „P2“ und „P3“ gekennzeichnet. Im nächsten Schritt wurde die definierte Lymphozytenpopulation im SSC-Plot *versus* Fluoreszenzintensität dargestellt und die Population markiert, die CD4 exprimieren (Abb. 7 D). Die ausgewählten  $CD4^+$  T-Zellen wurden auf ihre  $CD25^{high}CD127^{-/low}$  Expression analysiert, indem die Fluoreszenzintensitäten CD25-PE gegen CD127-APC dargestellt wurden (Abb. 7 E). Die nun als  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}$  definierten  $T_{REGS}$  wurden entsprechend ihrer CD49d Expression in die Subpopulationen  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^-$  und  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^+$  getrennt. Für die Sortierung der beiden Populationen wurden die Analysefenster wie in Abbildung 7 E und F angegeben, verwendet. Es wurden separate Analysen mit ungefärbten Zellen sowie einer FMO- (*fluorescence minus one*) Kontrolle durchgeführt. Dadurch konnten positiv gefärbte Zellen von der Autofluoreszenz ungefärbter Zellen unterschieden werden.

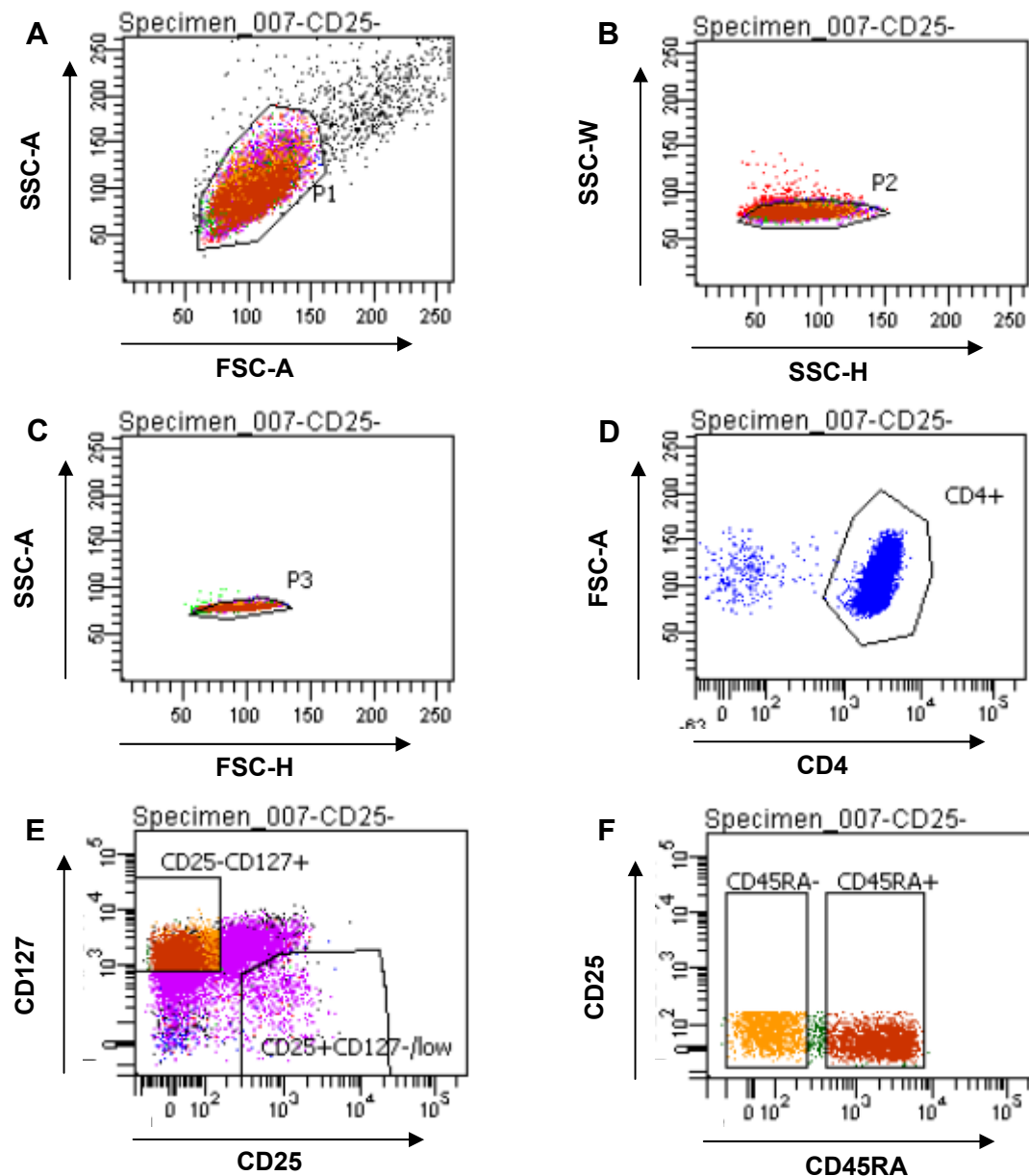


**Abb. 7: Durchflusszytometrische Isolation von  $T_{REG}$ -Zellen**

MACS-isolierte  $CD4^+CD25^+$   $T_{REGS}$  wurden mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern  $\alpha CD4$ ,  $\alpha CD25$ ,  $\alpha CD127$  und  $\alpha CD49d$  gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und für die funktionelle Analyse der  $T_{REGS}$  sortiert. **A - C)** Darstellung der FSC/SSC-Plots zur Kennzeichnung von Lymphozyten (P1) und Ausschluss von Dubletten (P2, P3). **D)**  $CD4^+$  Expression der in A bis C markierten Lymphozyten. **E)** Definition der  $T_{REGS}$  über die  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-low}$  Expression. **F)** Definition der  $T_{REG}$ -Subpopulationen über  $CD49d^-$  und  $CD49d^+$  Expression. Die Analysefenster in E und F wurden zugleich als „Sortierungsgates“ für die  $T_{REGS}$  verwendet. Die Abbildung entspricht einem repräsentativen Ergebnis der Zellanalyse und Sortierung von  $T_{REGS}$ .

Die  $CD4^+CD25^-T_{EFFS}$  wurden definiert als  $CD4^+CD25^-CD127^+$  T-Zellen (Abb. 8 E) und nach Färbung mit dem Oberflächenmarker  $CD45RA$  entsprechend in die  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+$  sowie in die  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^-$  Subpopulation

getrennt (Abb. 8 F). Die Hierarchie der einzelnen  $T_{\text{REG}}$ - und  $T_{\text{EFF}}$ -Subpopulationen ist in Abbildung 9 zusammengefasst.



**Abb. 8: Durchflusszytometrische Isolation von  $T_{\text{EFF}}$ -Zellen**

MACS-isolierte  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen wurden mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern  $\alpha CD4$ ,  $\alpha CD25$ ,  $\alpha CD127$  und  $\alpha CD45RA$  gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und sortiert. **A - C)** Darstellung der FSC/SSC-Plots zur Kennzeichnung von Lymphozyten (P1) und Ausschluss von Dupletten (P2, P3). **D)**  $CD4^+$  Expression der in A bis C markierten Lymphozyten. **E)**  $CD4^+CD25^-CD127^+$  Expression. **F)** Definition der  $T_{\text{EFF}}$ -Subpopulationen über  $CD45RA^-$  und  $CD45RA^+$  Expression. Die Analysefenster in E und F wurden zugleich als „Sortierungsgates“ für die  $T_{\text{EFF}}$ s verwendet. Die Abbildung entspricht einem repräsentativen Ergebnis der Zellanalyse und Sortierung von  $T_{\text{EFF}}$ s.

Abbildung 9 zeigt im Vergleich den prozentualen Anteil der T-Zellsubpopulationen  $CD4^+CD25^+$  und  $CD4^+CD25^-$  MACS-isolierter T-Zellen eines repräsentativen Experiments nach Färbung der Zellen mit dem „*Human Regulatory T Cell Cocktail*“ und der anschließenden FACS-Analyse. Es wurden jeweils 10.000 Zellen analysiert (10.000 „events“). Das Fenster „P3“ entspricht der reinen Lymphozyten-Population. Nach MACS-Isolation lag die Anreicherung der  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen bei 77,0 %, bei den  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen bei 87,0 %. Die prozentualen Anteile der  $CD4^+CD25^+$  T-Zell-Subpopulationen bezogen auf das Analysefenster „P3“ hatten Mittelwerte für  $CD4^+$  T-Zellen von 92,1 %, für  $CD25^{high}CD127^{-/low}$   $T_{REGS}$  von 59,6 %, für  $CD49d^-$   $T_{REGS}$  von 25,5 % und für  $CD49d^+$   $T_{REGS}$  von 28,9 %.

Die prozentualen Anteile der  $CD4^+CD25^-$  T-Zell-Subpopulationen bezogen auf das Analysefenster „P3“ hatten Mittelwerte für  $CD4^+$  T-Zellen von 97,2 %, für  $CD25^-CD127^+$   $T_{EFFS}$  von 40,0 %, für  $CD45RA^-$   $T_{EFFS}$  von 12,4 % und für  $CD45RA^+$   $T_{EFFS}$  von 27,5 %.

Nach der Zellsortierung wurde für die entsprechenden Subpopulationen eine Reanalyse durchgeführt, um die Reinheit der Zellen zu verifizieren. Die Reinheit lag bei > 97 %.

	A $CD25^+$			B $CD25^-$		
Population	Events	%Anteil	%Total	Events	%Anteil	%Total
All Events	10,000		100,0	10,000		100,0
P1	7,834	78,3	78,3	9,219	92,2	92,2
P2	7,546	96,3	75,5	8,998	97,6	90,0
P3	7,533	99,8	75,3	8,958	99,6	89,6
$CD4^+$	6,810	90,4	68,1	8,713	97,3	87,1
$CD25^+CD127^{-/low}$	4,019	59,0	40,2	555	6,4	5,6
$CD49d^-$	1,095	27,2	11,0	555	100,0	5,6
$CD49d^+$	2,672	66,5	26,7	0	0,0	0,0
$CD25^-CD127^+$	732	10,7	7,3	3,668	42,1	36,7
$CD45RA^-$	577	78,8	5,8	1,369	37,3	13,7
$CD45RA^+$	0	0,0	0,0	2,168	59,1	21,7

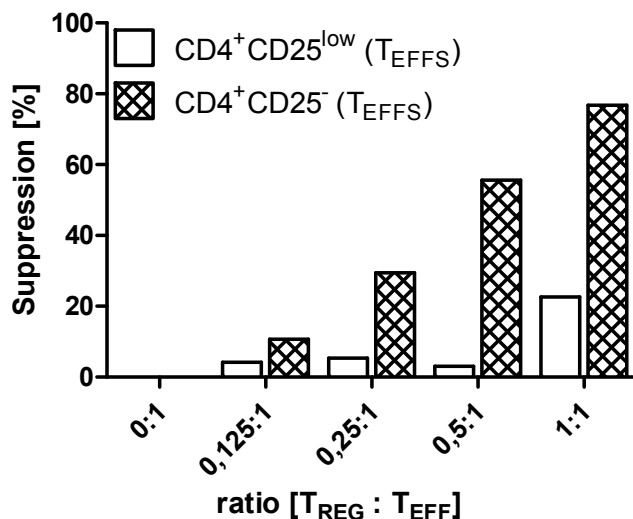
**Abb. 9: Hierarchie der  $CD4^+CD25^+$  und  $CD4^+CD25^-$  Subpopulationen**

A) Prozentualer Anteil von Subpopulationen MACS-isolierter  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen. B) Prozentualer Anteil von Subpopulationen MACS-isolierter  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentative FACS-Analysen der  $T_{REG}$ - und  $T_{EFF}$ -Zellen vor der Sortierung.

### 3.3 Heterogenität von T<sub>EFF</sub>-Zellen

#### 3.3.1 Supprimierbarkeit von CD25<sup>-</sup> versus CD25<sup>low</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen

Lymphozyten wurden aus humanen PBMCs zunächst mittels magnetischer Separation (MACS) für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen angereichert. Beide Zellpopulationen wurden mit dem „Human Regulatory T Cell Cocktail“ gefärbt (Kapitel 2.2.6) und anschließend durchflusszytometrisch sortiert. Aus der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellpopulation wurden die CD4<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> isoliert, die durch eine geringe Expression von CD127 und eine hohe Expression von CD25 gekennzeichnet sind, im Weiteren bezeichnet als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup> T<sub>REGS</sub>. Aus der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellpopulation wurden Effektorzellen isoliert, die CD25 in geringer Menge exprimieren, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> T<sub>EFFS</sub>, und solche, die kein CD25 exprimieren, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub>. Zur Feststellung unterschiedlicher Supprimierbarkeit beider Zellpopulationen durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup> T<sub>REGS</sub> wurden sie im *in vitro* Suppressions-Test analysiert. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup> T<sub>REGS</sub> wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (Abb. 10) mit einer konstanten Zahl von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> T<sub>EFFS</sub> oder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub> in Anwesenheit autologer bestrahlter PBMCs polyklonal stimuliert und 72 Stunden kultiviert.



**Abb. 10:** T<sub>REG</sub>-Zellen supprimieren CD25<sup>-</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen effizienter als CD25<sup>low</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen

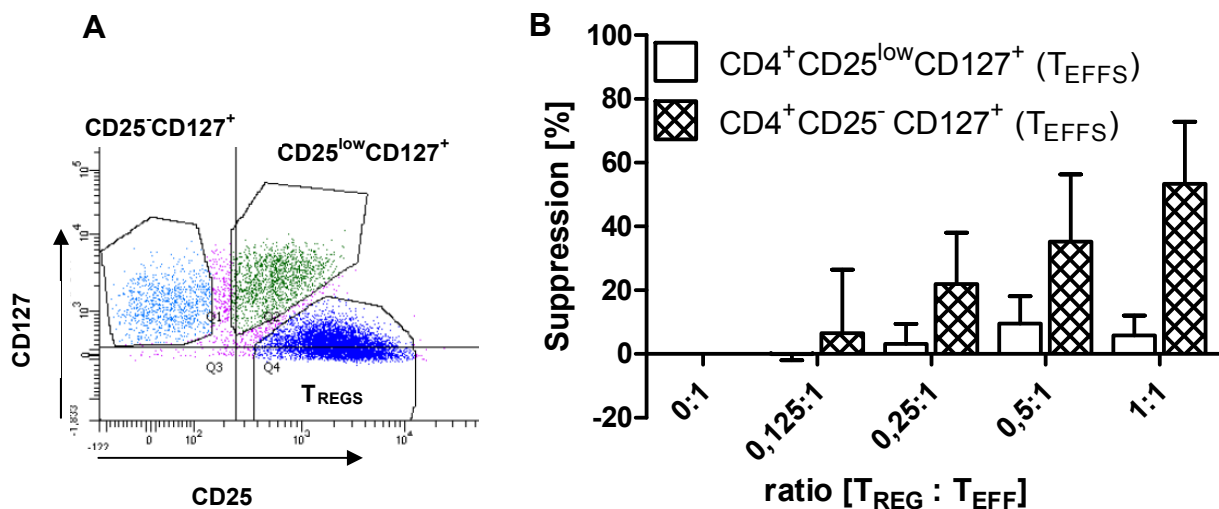
Die Histogramme repräsentieren die Suppression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen (schraffiert) sowie von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> (weiß) T<sub>EFF</sub>-Zellen im Vergleich. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. X-Achse: Verhältnis T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> in %.

Die Proliferation wurde über den Einbau von <sup>3</sup>[H]-Thymidin nach einem Zeitraum von 16 Stunden gemessen. Beide Effektorzellpopulationen werden dosisabhängig supprimiert.

Die suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low} T_{REGS}$  ist gegenüber  $CD25^- T_{EFFS}$  weitaus höher als gegenüber  $CD25^{low} T_{EFFS}$ . Bei einem Verhältnis  $T_{REG} : T_{EFF}$  von 1:1 beträgt der Unterschied 77 % zu 23 %, bei einem Verhältnis von 0,5:1 beträgt der Unterschied 56 % zu 3 %. Dieses Ergebnis impliziert, dass die suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low} T_{REGS}$  direkt abhängig ist von den angebotenen  $T_{EFFS}$ .

### 3.3.2 Supprimierbarkeit von $CD127^+CD25^-$ versus $CD127^+CD25^{low} T_{EFF}$ -Zellen

$CD4^+$  T-Zellen können entsprechend ihrer Interleukin-Rezeptoren CD25 und CD127 in drei Subklassen eingeteilt werden. Die  $CD4^+CD25^{low}CD127^+$  Subpopulation, die  $CD4^+CD25^-CD127^+$  Subpopulation und die  $CD4^+CD25^{-/low}CD127^+$  Subpopulation. In diesem Experiment wurden über den Oberflächenmarker CD127 Effektorzellen isoliert, die wie im vorherigen Experiment (Kapitel 3.3.1) weiter unterteilt wurden in  $CD4^+CD25^-CD127^+ T_{EFFS}$  sowie  $CD4^+CD25^{low}CD127^+ T_{EFFS}$ . Die FACS-Sortierung der  $T_{REGS}$  und  $T_{EFFS}$  eines repräsentativen Experiments zeigt Abbildung 11.



**Abb. 11:**  $T_{REG}$ -Zellen supprimieren  $CD25^-CD127^+ T_{EFF}$ -Zellen effizienter als  $CD127^+CD25^{low} T_{EFF}$ -Zellen

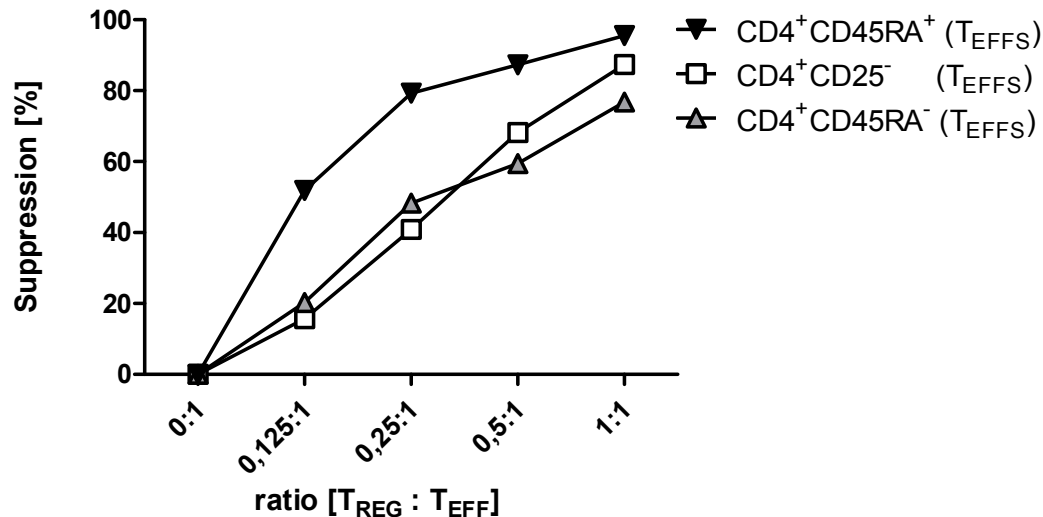
Die Histogramme repräsentieren die Suppression der  $CD4^+CD25^-CD127^+ T_{EFFS}$  (schraffiert) und  $CD4^+CD25^{low}CD127^+ T_{EFFS}$  (weiß) im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus zwei Experimenten. X-Achse: Verhältnis  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der  $T_{REGS}$  in %.

Die  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low} T_{REGS}$  supprimierten dosisabhängig die  $\alpha$ -CD3 stimulierte Proliferation der  $CD25^-CD127^+ T_{EFF}$ -Zellen, während die  $CD25^{low}CD127^+ T_{EFFS}$  nur geringfügig supprimiert wurden. Die Inhibition der Proliferation von  $CD4^+CD25^-CD127^+ T_{EFFS}$  liegt dosisabhängig bei 7 %, 22 %, 35 % und 53 % (ratio [ $T_{REG} : T_{EFF}$ ; 0,125:1; 0,25:1; 0,5:1 und 1:1]). Dieses Ergebnis bestätigt den Befund unter 3.3.1, das  $CD25^- T_{EFFS}$  sehr effektiv supprimiert werden, während  $CD25^{low} T_{EFFS}$  kaum supprimiert werden.

### 3.3.3 Supprimierbarkeit von $CD4^+CD45RA^+$ versus $CD4^+CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen

Die Elimination von  $CD127^-$  Effektorzellen aus der  $CD25^{low} T_{EFFS}$  und  $CD25^- T_{EFFS}$  erbrachte keine weitere Information zur Supprimierbarkeit von Effektorzellen, bestätigte jedoch die bessere Supprimierbarkeit von  $CD25^- T_{EFFS}$  versus  $CD25^{low} T_{EFFS}$ . Da  $CD25$  eher auf aktivierten als auf naiven T-Lymphozyten exprimiert wird, wurde nun ein weiterer Aktivierungsmarker zur Unterscheidung der Effektorzellen herangezogen. Naive T-Zellen exprimieren den Oberflächenmarker  $CD45RA$ , während aktivierten und Gedächtnis- („memory“)-T-Zellen die Expression von  $CD45RA$ ,  $RB$  sowie  $RC$  fehlt, sie sind  $CD45RO$ .

Aus *buffy-coats* wurden zunächst mittels magnetischer Zellseparation (MACS)  $CD4^+CD25^{-/low}$  Lymphozyten angereichert und anschließend durchflusszytometrisch in die  $CD4^+CD45RA^+$  und  $CD4^+CD45RA^- T_{EFF}$ -Subpopulationen sortiert. Die funktionelle Aktivität von  $CD4^+CD25^+ T_{REG}$ -Zellen wurde mit dem *in vitro* Suppressions-Test überprüft.  $CD4^+CD25^+ T_{REG}$ -Zellen supprimierten  $CD4^+CD25^{-/low}CD45RA^+ T_{EFF}$ -Zellen bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 1:1 mit einer Effektivität von nahezu 100 %. Bei einem Verhältnis von 0,125:1 lag die Effektivität der  $T_{REGS}$  noch über 50 % (Abb. 12). Im Gegensatz hierzu wurden  $CD4^+CD25^{-/low}CD45RA^- T_{EFFS}$  bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 1:1 zu 77 % supprimiert und bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 0,125:1 zu 20 %. Im Vergleich dazu wurden  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 1:1 zu 87 % und bei einem Verhältnis von 0,125:1 zu 16 % supprimiert.  $CD4^+CD25^+ T_{REG}$ -Zellen waren in ihrer suppressiven Aktivität gegenüber naiven  $CD4^+CD25^{-/low}CD45RA^+ T_{EFF}$ -Zellen insbesondere bei niedrigen  $T_{REG} : T_{EFF}$  ratios weitaus effektiver als gegenüber  $CD4^+CD25^{-/low}CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen oder  $CD4^+CD25^- T_{EFF}$ -Zellen.



**Abb. 12:** Suppressive Aktivität von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen gegenüber FACS-isolierter CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen

Die Graphen repräsentieren die Suppression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (weißes Quadrat), CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (schwarzes Dreieck) sowie CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (graues Dreieck) der drei unterschiedlichen T<sub>EFF</sub>-Zellpopulationen. Die mittlere Suppression der drei Effektorzellpopulationen wurde aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet. X-Achse: Verhältnis T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> in %.

### 3.4 Heterogenität von T<sub>REG</sub>-Zellen

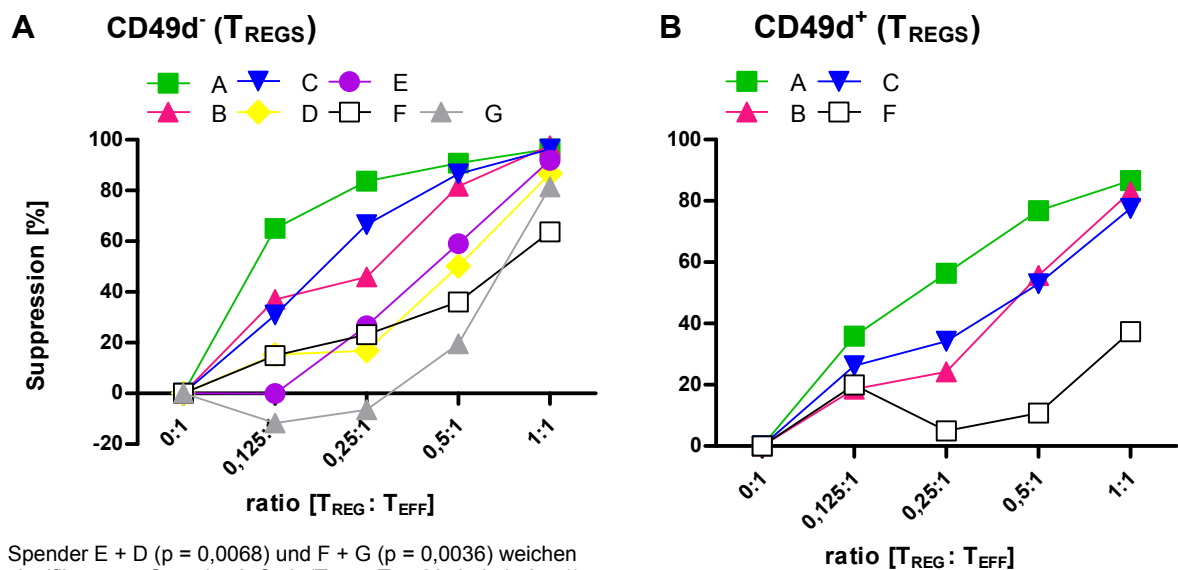
#### 3.4.1 Suppressive Aktivität von CD25<sup>high</sup>CD49d<sup>-</sup> versus CD25<sup>high</sup>CD49d<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen

Zur Unterscheidung der suppressiven Aktivität von aktivierten und nicht aktivierten T<sub>REG</sub>-Zellen wurde der Oberflächenmarker CD49d verwendet. CD49d entspricht der Integrin  $\alpha 4$ -Kette, die zusammen mit der  $\beta 1$ -Kette (CD29) das VLA-4 Molekül bildet und zusammen mit der  $\beta 7$ -Kette das  $\alpha 4\beta 7$  Integrin. Die beiden Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle  $\alpha 4\beta 1$  bzw. *homing*-Rezeptoren  $\alpha 4\beta 7$ .

Die Analyse der suppressiven Aktivität von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup>CD49d<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup>CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> wurde mit dem *in vitro* Suppressions-Test untersucht. Dazu wurden humane PBMCs mittels magnetischer Separation in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Zellen isoliert und nach Färbung mit dem „Human Regulatory T Cell Cocktail“ (CD4, CD25, CD127) sowie CD49d in die Subpopulationen

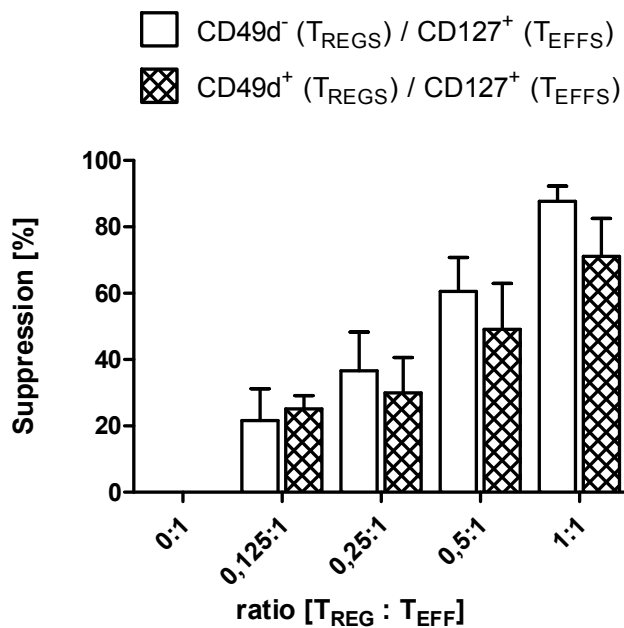


CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-low</sup>CD49d<sup>-</sup> sowie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-low</sup>CD49d<sup>+</sup> durchflusszytometrisch sortiert. Jede der Subpopulationen wurde im gleichen zunehmenden Verhältnis mit einer konstanten Zahl von FACS-isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> T<sub>EFFS</sub> in Anwesenheit autologer PBMCs mit α-CD3 stimuliert und 72 Stunden ko-kultiviert. Abbildung 13 zeigt von sieben Spendern jeweils die suppressive Aktivität von CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> (A) und CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> (B) gegenüber CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> T<sub>EFFS</sub>. Von den Spendern D, E und G (Abb. 13B) konnten nicht genügend CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> für eine funktionelle Analyse isoliert werden. Abbildung 14 ist der Vergleich der suppressiven Aktivität von CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> und CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> von jeweils sieben bzw. vier Spendern mit Mittelwerten und Standardfehler zu entnehmen. Sowohl CD49d<sup>-</sup> als auch CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> inhibierten die Proliferation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> T<sub>EFFS</sub> dosisabhängig. Die suppressive Aktivität von CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> war höher (88% ± 4,6 %; ratio 1:1) als die von CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> (71% ± 11,4 %; ratio 1:1). Obgleich die suppressive Aktivität von Spender zu Spender variierte, zeigten die CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> jeweils eine deutlich stärkere Suppression als die CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub>. Dieser Befund belegt, dass sowohl bereits aktivierte als auch nicht aktivierte T<sub>REGS</sub> eine suppressive Funktion aufweisen.



**Abb. 13: Suppressive Aktivität von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-low</sup>CD49d<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-low</sup>CD49d<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen**

**A)** Suppressive Aktivität von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-low</sup>CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> gegenüber CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> T<sub>EFFS</sub>. Dargestellt sind die Daten aus sieben unabhängigen Experimenten. **B)** Suppressive Aktivität von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-low</sup>CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> gegenüber CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> T<sub>EFFS</sub>. Dargestellt sind die Daten aus vier unabhängigen Experimenten. Graph A, B, C und F repräsentieren in A) und B) jeweils die Ergebnisse desselben Spenders. X-Achse: Verhältnis T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> in %.

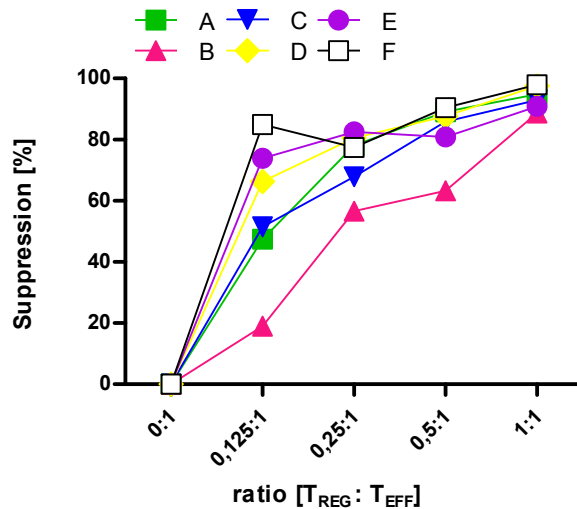
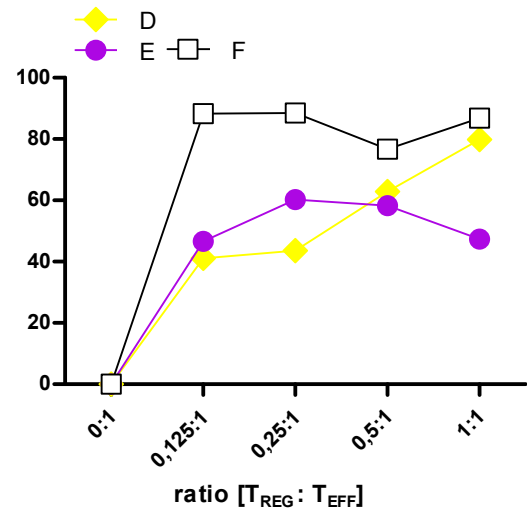
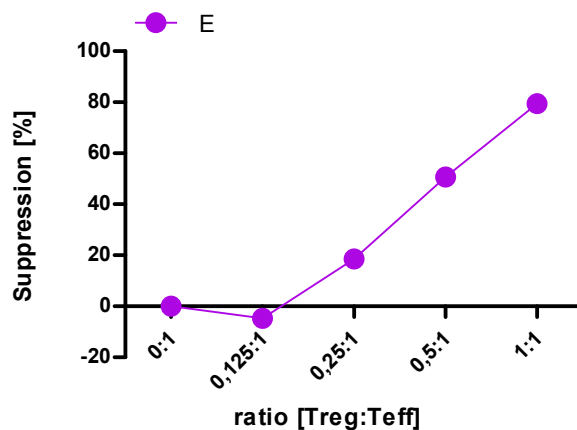
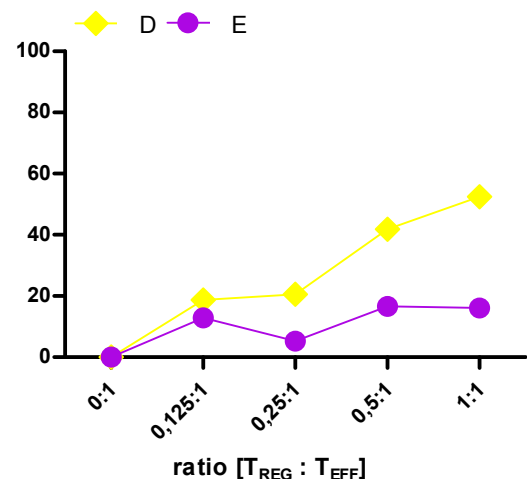


**Abb. 14: Suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD49d^-$  und  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD49d^+$  T<sub>REG</sub>-Zellen**

Daten aus sieben ( $CD49d^-$  T<sub>REGS</sub>; weißer Balken) und vier ( $CD49d^+$  T<sub>REGS</sub>; schraffierter Balken) unabhängigen Experimenten (Einzeldaten Abb. 13) wurden zusammengefasst und als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. X-Achse: Verhältnis T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> in %.

### 3.4.2 Suppressive Aktivität von $CD25^{high}CD49d^-$ versus $CD25^{high}CD49d^+$ T<sub>REG</sub>-Zellen gegenüber $CD45RA^+$ oder $CD45RA^-$ T<sub>EFF</sub>-Zellen

Unter 3.3.3 wurde bereits gezeigt, dass T<sub>REGS</sub> gegenüber naiven  $CD4^+CD45RA^+$  T<sub>EFF</sub>-Zellen eine höhere suppressive Aktivität aufweisen als gegenüber aktivierten  $CD4^+CD45RA^+$  T<sub>EFF</sub>-Zellen. Die suppressive Aktivität von naiven  $CD49d^-$  und aktivierten  $CD49d^+$  T<sub>REGS</sub> wurde nun gegenüber beiden T<sub>EFF</sub>-Zell-Populationen untersucht. Aus humanen PBMCs wurden mittels MACS-Separation  $CD4^+CD25^-$  T<sub>EFFS</sub> isoliert und anschließend durchflusszytometrisch in  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+$  und  $CD45RA^-$  Subpopulationen sortiert (FACS-Daten Kapitel 3.2). T<sub>REG</sub>-Zellen wurden entsprechend 3.4.1 in  $CD49d^-$  und  $CD49d^+$  Subpopulationen sortiert. Die suppressive Aktivität beider T<sub>REG</sub>-Subpopulationen wurde nun auf Unterschiede gegenüber  $CD4^+CD25^-CD45RA^+$  und  $CD4^+CD25^-CD45RA^-$  T<sub>EFFS</sub> im *in vitro* Suppressions-Test getestet. Die funktionellen Analysen einzelner Spender sind Abbildung 15 A-D zu entnehmen. Die Suppression von  $CD49d^-$  und  $CD49d^+$  T<sub>REGS</sub> gegenüber  $CD45RA^+$  T<sub>EFFS</sub> sind in Abbildung 15 A und B gezeigt, während in Abbildung 15 C und D die suppressive Aktivität gegenüber  $CD45RA^-$  T<sub>EFFS</sub> dargestellt ist.

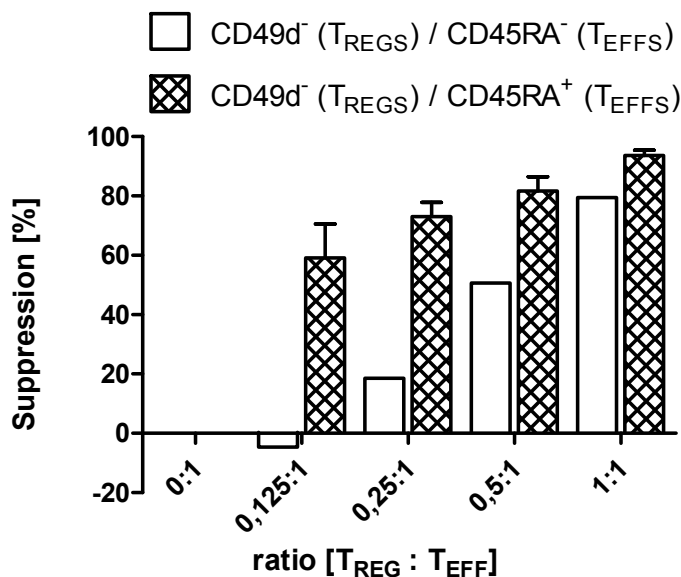
**A**  $CD49d^- (T_{REGS}) / CD45RA^+ (T_{EFFS})$ **B**  $CD49d^+ (T_{REGS}) / CD45RA^+ (T_{EFFS})$ **C**  $CD49d^- (T_{REGS}) / CD45RA^- (T_{EFFS})$ **D**  $CD49d^+ (T_{REGS}) / CD45RA^- (T_{EFFS})$ 

**Abb. 15: Suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{/low}CD49d^-$  und  $CD49d^+$   $T_{REG}$ -Zellen gegenüber  $CD4^+CD25^+CD127^+CD45RA^+$  und  $CD45RA^-$   $T_{EFF}$  Zellen**

In den Graphen A-D sind die Ergebnisse der Suppressions-Tests unterschiedlicher  $T_{REG}$ - und  $T_{EFF}$ -Zell Kombinationen dargestellt. **A)**  $CD4^+CD25^{high}CD127^{/low}CD49d^-$   $T_{REGS}$  gegenüber  $CD4^+CD25^+CD127^+CD45RA^+$   $T_{EFFS}$  (sechs unabhängige Experimente) **B)**  $CD4^+CD25^{high}CD127^{/low}CD49d^+$   $T_{REGS}$  gegenüber  $CD4^+CD25^+CD127^+CD45RA^+$   $T_{EFFS}$  (drei unabhängige Experimente) **C)**  $CD4^+CD25^{high}CD127^{/low}CD49d^-$   $T_{REGS}$  gegenüber  $CD4^+CD25^+CD127^+CD45RA^-$   $T_{EFFS}$  (ein Experiment) und **D)**  $CD4^+CD25^{high}CD127^{/low}CD49d^+$   $T_{REGS}$  gegenüber  $CD4^+CD25^+CD127^+CD45RA^-$   $T_{EFFS}$  (zwei unabhängige Experimente). Graphen derselben Farbe in A-D repräsentieren jeweils die Daten des gleichen Spenders. X-Achse: Verhältnis  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der  $T_{REGS}$  in %.

Die zusammenfassenden Ergebnisse mit Mittelwerten und Standardfehler sind den Abbildung 16 und 17 zu entnehmen. Aufgrund des sehr geringen Zellanteils von  $CD4^+CD25^-CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen in humanen PBMCs war die funktionelle Analyse der  $CD49d^-$  und  $CD49d^+ T_{REGS}$  hinsichtlich ihrer Wirkung auf  $CD4^+CD25^-CD45RA^- T_{EFFS}$  auf jeweils einen bzw. zwei Spender begrenzt.

Die suppressive Aktivität von  $CD49d^- T_{REGS}$  war gegenüber beiden  $T_{EFF}$ -Zell-Populationen dosisabhängig. Sie war jedoch gegenüber naiven  $CD45RA^+ T_{EFF}$ -Zellen weitaus effizienter als gegenüber aktivierten  $CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen. Bei einem Verhältnis von 1:1 wurden  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  zu 94 % ( $\pm 1,5$  %) und  $CD45RA^- T_{EFFS}$  zu 80 % supprimiert. Bei einem Verhältnis von 0,25:1 hingegen wurden  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  zu 73 % ( $\pm 4,0$  %) und  $CD45RA^- T_{EFFS}$  nur noch zu 19 % supprimiert.

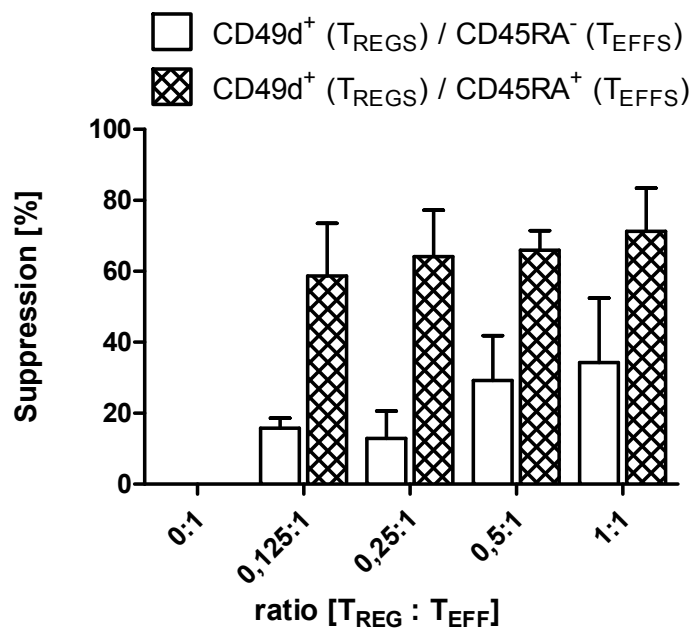


**Abb. 16: Suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD49d^- T_{REG}$ -Zellen gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+$  und  $CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen**

Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten für die Suppression von  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  (schraffierter Balken) und sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die suppressive Aktivität von  $T_{REGS}$  gegenüber  $CD45RA^- T_{EFFS}$  (weißer Balken) wurde aus zwei Experimenten zusammengefasst. (Suppression bei einer  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zell Ratio von 1:1:  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  93,6 %;  $CD45RA^- T_{EFFS}$  79,5 %). X-Achse: Verhältnis  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der  $T_{REGS}$  in %.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, inhibieren auch die aktivierten  $CD49d^+ T_{REGS}$  die Proliferation beider  $T_{EFF}$ -Subpopulationen. Die suppressive Aktivität der aktivierten  $CD49d^+ T_{REG}$ -Zellen ist auch hier gegenüber naiven  $CD45RA^+ T_{EFF}$ -Zellen stärker ausgeprägt als ge-

genüber  $CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen. Bei einem Verhältnis von 1:1 wurden  $CD45RA^+ T_{EFF}$ -Zellen zu 71 % ( $\pm 12,2$  %) und  $CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen zu 34 % ( $\pm 18,2$  %) supprimiert.



**Abb. 17:** Suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD49d^+ T_{REG}$ -Zellen gegenüber  $CD4^+CD25^+CD127^+CD45RA^+ T_{EFF}$ -Zellen und  $CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen

Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten für die Suppression von  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  (schraffierter Balken) und sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die Suppression von  $CD45RA^- T_{EFFS}$  (weißer Balken) wurde aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. (Suppression bei einer  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zell Ratio von 1:1:  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  71,3 %;  $CD45RA^- T_{EFFS}$  34,3 %). X-Achse: Verhältnis  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zellen, Y-Achse: Suppressive Aktivität der  $T_{REGS}$  in %.

Zusammenfassend zeigen beide  $T_{REG}$ -Populationen suppressive Aktivität, wobei die  $CD49d^- T_{REGS}$  wesentlich effizienter supprimieren als  $CD49d^+ T_{REGS}$ . Sowohl  $CD49d^- T_{REGS}$  als auch  $CD49d^+ T_{REGS}$  weisen eine stärkere suppressive Aktivität gegenüber naiven  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  auf als gegenüber aktivierten  $CD45RA^- T_{EFFS}$ .

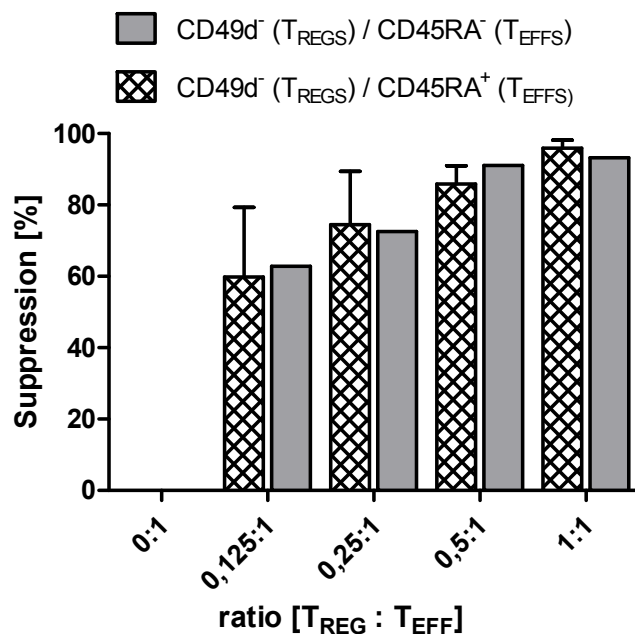
### 3.4.3 Suppressive Aktivität von $CD25^{high}CD49d^- T_{REG}$ -Zellen aus peripherem Blut

Die Frequenz humaner  $CD4^+CD25^{high} T_{REG}$ -Zellen im peripheren Blut ist mit 1 - 2 % der mononukleären Zellen sehr gering. Werden die  $T_{REG}$ -Zellen noch weiter aufgereinigt zu  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD49d^- T_{REGS}$ , sind funktionelle Analysen aus geringen Mengen

(ca. 50 ml) von peripherem Blut gesunder Spender und Patienten eingeschränkt. Hier wurde eine Machbarkeitsstudie durchgeführt und bei gleichbleibenden  $[T_{REG} : T_{EFF}]$  Verhältnissen (0,125:1; 0,25:1; 0,5:1 und 1:1) die Zahl der  $T_{EFFS}$  auf 25.000 oder 16.000 reduziert, wobei sich auch die Anzahl der benötigten  $T_{REGS}$  reduzierte.

In der ersten Studie wurden die  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  wie bisher aus *buffy-coats* isoliert und ihre suppressive Aktivität gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+$  und  $CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen bestimmt.

Die suppressive Aktivität der  $CD49d^- T_{REG}$ -Subpopulation wurde in den  $[T_{REG} : T_{EFF}]$  Verhältnissen 0,125:1; 0,25:1; 0,5:1 und 1:1 bei konstanter Anzahl von 50.000  $T_{EFFS}$  bestimmt. Nach 72 Stunden Ko-Kultivierung in Gegenwart von PBMCs (syngen) und  $\alpha$ -CD3 wurde  $^3[H]$ -Thymidin zugesetzt und für weitere 16 Stunden kultiviert. Die suppressive Aktivität von  $CD49d^- T_{REGS}$  (*buffy-coat*) gegenüber allogenen naiven  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  und aktivierten  $CD45RA^- T_{EFFS}$  (peripheres Blut) war nahezu gleich gut (Abb. 18).

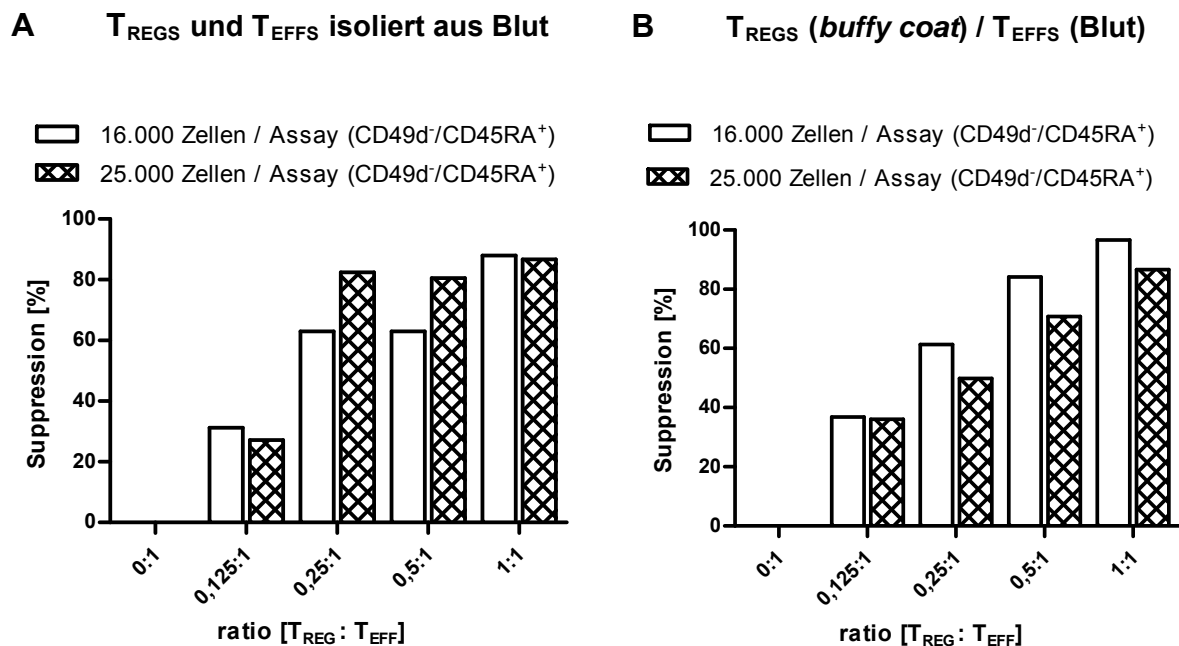


**Abb. 18:** Suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REG}$ -Zellen (*buffy-coat*) gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+$  und  $CD45RA^- T_{EFF}$ -Zellen (peripheres Blut)

Schraffierte Balken repräsentieren die suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  gegenüber  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  und sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Graue Balken repräsentieren die suppressive Aktivität von  $T_{REGS}$  gegenüber  $CD45RA^- T_{EFFS}$  aus einem Experiment. X-Achse: Verhältnis  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zellen; Y-Achse: Suppressivität der  $T_{REGS}$  in %.

In der zweiten Studie wurden die Zellzahlen von 50.000  $T_{EFF}$ -Zellen auf 25.000 und 16.000 reduziert und die  $[T_{REG} : T_{EFF}]$  Verhältnisse von 0,125:1; 0,25:1; 0,5:1 und 1:1 beibehalten. Dieses Mal wurden sowohl die  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REG}$ -Zellen als auch die  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+ T_{EFF}$ -Zellen aus peripherem Blut isoliert und mit autologen bestrahlten PBMCs ko-kultiviert. Eine suppressive Aktivität der  $CD49d^- T_{REG}$  ließ sich sowohl in einem Suppressions-Test mit 25.000 Zellen als auch mit 16.000 Zellen feststellen (Abb. 19 A).

Ein vergleichbares Ergebnis ließ sich auch mit allogenen  $CD49d^- T_{REG}$ -Zellen erzielen, welche wie die PBMCs aus mononukleären Zellen eines *buffy-coats* isoliert wurden, während die  $CD45RA^+ T_{EFF}$ -Zellen aus peripherem Blut gewonnen wurden. Eine suppressive Aktivität der  $CD49d^- T_{REGS}$  gegenüber  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  wurde sowohl mit 16.000 als auch 25.000 Zellen / Test erzielt (Abb. 19).



**Abb. 19: Vergleich der suppressiven Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REG}$ -Zellen mit jeweils 16.000 und 25.000 eingesetzten Zellen / Test**

**A)** Suppressions-Test mit  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  und  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+ T_{EFFS}$  isoliert aus peripherem Blut. **B)** Suppressions-Test mit  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  isoliert aus *buffy-coat* und  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+ T_{EFFS}$  isoliert aus peripherem Blut. Jeweils  $1,6 \times 10^4$  oder  $2,5 \times 10^4$   $T_{EFFS}$  wurden mit  $T_{REGS}$  in den Verhältnissen  $[T_{REG} : T_{EFF}]$  0,125:1; 0,25:1; 0,5:1 sowie 1:1 zusammen mit  $1 \times 10^5$  bestrahlter (30 Gy) PBMCs in Anwesenheit von 0,25 µg/ml α-CD3 stimuliert. Nach 72 h Aktivierung wurde  $^3[H]$ -Thymidin zugefügt und die Proliferation der Zellen nach weiteren

16 h gemessen. X-Achse: Verhältnis  $T_{REG} : T_{EFF}$  Zellen; Y-Achse: Suppressive Aktivität der  $T_{REGS}$  in %.

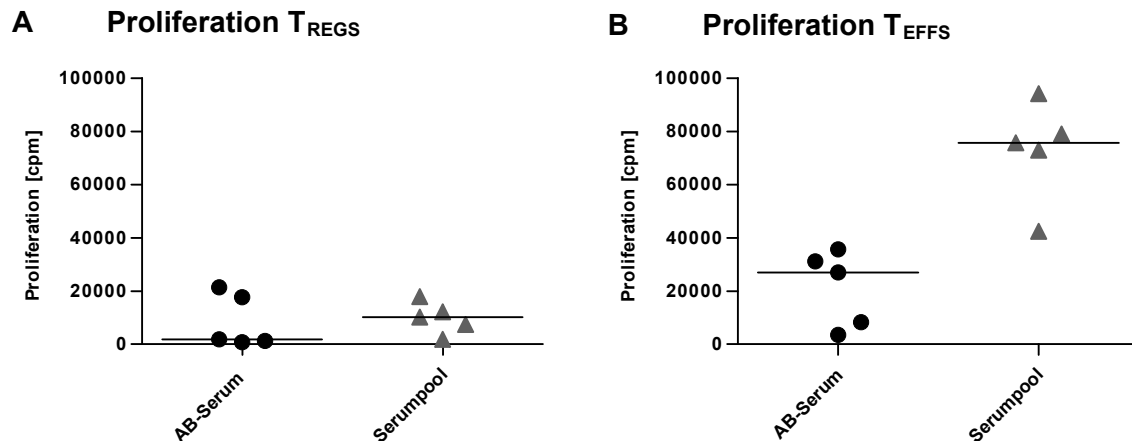
In beiden Tests war die suppressive Aktivität der  $T_{REGS}$  gegenüber  $T_{EFFS}$  dosisabhängig und betrug bei 25.000 Zellen / Test 36 %, 50 %, 71 % sowie 87 % und bei 16.000 Zellen / Test 37 %, 61 %, 84 % sowie 97 %.

Zusammenfassend ist hier gezeigt, dass die Zellzahl, zur Analyse der suppressiven Aktivität von  $T_{REGS}$ , reduziert werden kann. Zudem können  $T_{REGS}$  aus dem peripheren Blut eines Patienten auf allogenen Zellen eines Spenders (*buffy-coat*) getestet werden. Sollen die  $T_{EFFS}$  von Patienten analysiert werden, so können aus dem *buffy-coat* eines Spenders  $T_{REGS}$  isoliert und auf  $T_{EFFS}$  von Patienten getestet werden. Sollen  $T_{REGS}$  mehrerer Patienten im direkten Vergleich getestet werden, können die  $T_{EFFS}$  von einem Spender (*buffy-coat*) verwendet werden.

### **3.5 Einfluss des Kulturmediums auf die Proliferation und Suppression von $T_{REG}$ -Zellen**

Für die Kultivierung der T-Zellen im *in vitro* Suppressions-Test wurden zwei verschiedene Kulturmedien eingesetzt, die sich im humanen Serum unterscheiden. Die Zugabe von 10 % AB-Serum (Pool von weiblichen und männlichen Spendern) zum Kulturmedium (RPMI 1640) und eine polyklonale Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 Antikörpern induzierte eine geringe Proliferation von  $T_{REG}$ -Zellen (Median 1205 cpm) und eine mittlere Proliferation von  $T_{EFF}$ -Zellen (Median 27004 cpm). Bei einer Kultivierung der Zellen in Medium mit 10 % Serum (Pool von männlichen Spendern) war sowohl die Proliferation der  $T_{REG}$ -Zellen (Median 10224 cpm) höher (ca. 8-fach) als auch die Proliferation der  $T_{EFF}$ -Zellen (Median 75633 cpm) höher (ca. 3-fach; Abb. 20 A und B).

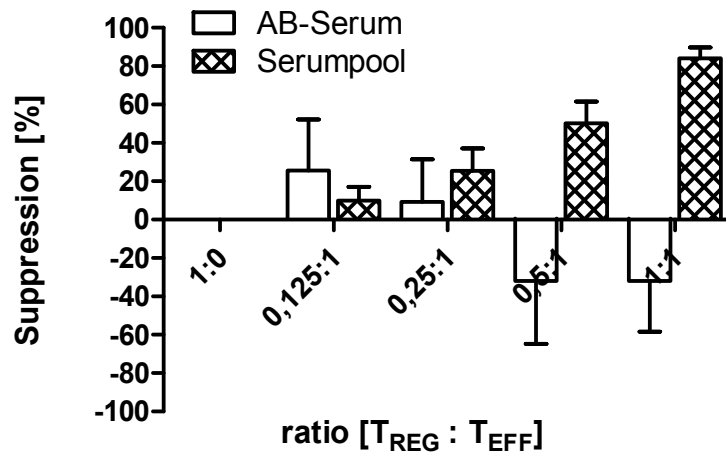




**Abb. 20: Proliferation der  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD49d^-$  T<sub>REG</sub><sup>-</sup> und  $CD4^+CD25^-CD127^+$  T<sub>EFF</sub><sup>-</sup>-Zellen nach Kultivierung in Medien mit unterschiedlichen humanen Seren**

**A)** Proliferation der  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD49d^-$  T<sub>REGS</sub> nach vier Tagen Kultivierung in Medium unter Zusatz von humanem AB-Serum oder einem Serumpool von ausschließlich männlichen Spendern. **B)** Proliferation der  $CD4^+CD25^-CD127^+$  T<sub>EFFS</sub> nach vier Tagen Kultivierung in Medium unter Zusatz von humanem AB-Serum oder einem Serumpool von ausschließlich männlichen Spendern. Es wurden jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen zusammen mit  $1 \times 10^5$  bestrahlten (30 Gy) PBMCs 72 h kokultiviert. Nach Zugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidin für weitere 16 h wurde die Proliferation der Zellen anhand des Tritium-Einbaus in die DNA der Zellen in cpm gemessen. Die Balken repräsentieren jeweils den Median von fünf unabhängigen Experimenten.

Zur Messung der funktionellen Aktivität der T<sub>REG</sub>-Zellen wurde der *in vitro* Suppressions-Test verwendet. Eine suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> war nur bei Kultivierung in Medium mit Serum von männlichen Spendern nachweisbar (Abb. 21). Die suppressive Aktivität der T<sub>REGS</sub> gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+$  T<sub>EFFS</sub> war dosisabhängig. Im Vergleich hierzu konnte in Gegenwart von AB-Serum (Pool männlicher und weiblicher Spender) keine suppressive Aktivität von T<sub>REGS</sub> gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+$  T<sub>EFFS</sub> festgestellt werden (Abb. 21).



**Abb. 21: Suppressiv Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD49d^-$  T<sub>REG</sub>-Zellen nach Kultivierung in unterschiedlichen humanen Seren**

FACS isolierte  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD49d^-$  T<sub>REG</sub>-Zellen wurden in den Verhältnissen 0,125:1; 0,25:1; 0,5:1 und 1:1 zusammen mit  $5 \times 10^4$  FACS isolierten  $CD4^+CD25^-CD127^+$  T<sub>EFFS</sub> und  $1 \times 10^5$  bestrahlten (30 Gy) PBMCs ko-kultiviert. Die Histogramme repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler jeweils fünf unabhängigen Experimenten. Die weißen Balken repräsentieren die Suppressions-Tests, die in Gegenwart von AB-Serum (Pool männlicher und weiblicher Spender) durchgeführt wurden, die schraffierten Balken zeigen die Suppressions-Tests, die in Gegenwart von Serum durchgeführt wurden, das ausschließlich von männlichen Spendern stammte. X-Achse: Verhältnis T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Zellen, Y-Achse: Suppression der Effektor T-Zell Population in %.

Möglicherweise beeinflusst der Anteil an weiblichen Serumspendern im AB-Pool die funktionelle Aktivität von T<sub>REGS</sub>. Anti-HLA Antikörper, die eher im Serum weiblicher als männlicher Spender erwartet werden, konnten jedoch als Ursache ausgeschlossen werden. Diese Untersuchung wurde freundlicherweise im Institut für Transfusionsmedizin Dr. Heine-mann durchgeführt.

## 4 Diskussion

Regulatorische T-Zellen sind im Fokus immunologischer Forschung, weil man in der klinischen Anwendung von T<sub>REG</sub>-Zellen ein großes Potential für Prävention und Remission von Autoimmunerkrankungen oder bei allogenen Transplantationen sieht. Bei Tumoren hingegen interferieren nT<sub>REG</sub>-Zellen und / oder iT<sub>REG</sub>-Zellen mit der gezielten Immunabwehr gegenüber veränderten körpereigenen Zellen. Trotz umfangreicher Daten bestehen noch viele offene Fragen bezüglich der Physiologie bzw. Pathophysiologie von T<sub>REG</sub>-Zellen. Einerseits ist die funktionelle Bedeutung von nT<sub>REG</sub>-Zellen und iT<sub>REG</sub>-Zellen noch nicht genau bekannt und andererseits sind die Suppressionsmechanismen der beiden T<sub>REG</sub>-Zell-Populationen nicht ausreichend geklärt. Weiterhin ist unklar, inwieweit *in vitro* Daten oder tierexperimentelle Befunde auf Pathomechanismen beim Menschen übertragbar sind.

Initiale Studien beim Menschen basierten auf der Annahme, dass CD25<sup>+</sup> nT<sub>REG</sub>-Zellen phänotypisch und funktionell eine homogene Population darstellen und ein numerischer oder funktioneller Verlust von nT<sub>REG</sub>-Zellen zur Autoimmunität führt. Hierfür spricht, dass der komplette Verlust von FoxP3 positiven T<sub>REG</sub>-Zellen sowohl bei der Maus als auch beim Menschen zu Autoimmunphänomenen führt (Brunkow *et al.* 2001; Bennett *et al.* 2001). Inwieweit auch partielle Verluste von nT<sub>REG</sub>-Zellen zur Autoimmunität beitragen oder ob vorübergehende Defizite von T<sub>REG</sub>-Zellen zur Manifestation von Autoimmunität führen und nach einem Anstieg von nT<sub>REG</sub>-Zellen Autoimmunität wieder kontrollierbar ist, ist ungeklärt. Direkte Vergleiche von gesunden Probanden und Patienten mit Autoimmunerkrankungen bezüglich der Anzahl und funktionellen Aktivität von nT<sub>REG</sub>-Zellen dokumentieren a) numerische Unterschiede, b) keine numerischen Unterschiede bis hin zu c) keine numerischen, aber funktionellen Unterschiede. Bei der überwiegenden Anzahl der Publikationen sind Defizite von nT<sub>REG</sub>-Zellen zwar häufiger in der Gruppe der Patienten zu beobachten aber bei einem hohen Anteil der Patienten liegt die nT<sub>REG</sub>-Zell Aktivität im gleichen, relativ großen Schwankungsbereich wie die von der Vergleichsgruppe (Viglietta *et al.* 2004; Haas *et al.* 2005; Putnam *et al.* 2005; Kumar *et al.* 2006). In einigen Arbeiten wird das Defizit in der suppressiven Kapazität der nT<sub>REG</sub>-Zellen gesehen (Haas *et al.* 2005; Venken *et al.* 2008; Fletcher *et al.* 2009). Insgesamt weisen diese Befunde darauf hin, dass sowohl die untersuchten T<sub>REG</sub>- als auch die T<sub>EFF</sub>-Zellen heterogen sein könnten. Ziel meines Projekts war es, die Heterogenität der T<sub>REG</sub>- als auch die der T<sub>EFF</sub>-Zellpopulationen zu untersuchen.

## 4.1 Methodische Aspekte

Die suppressive Kapazität der  $CD4^+CD25^+$   $T_{REG}$ -Zell-Subpopulationen wurde mit einem *in vitro* Suppressions-Test durchgeführt. Der *in vitro* Suppressions-Test zählt zu den Standardmethoden, um suppressive Aktivität von  $T_{REG}$ -Zellen zu analysieren (Thornton & Shevach 1998). Für den Test wurden frisch isolierte Zellen eingesetzt. Als Feederzellen dienten bestrahlte autologe PBMCs. Gegenüber alternativen Methoden, Verwendung von Makrophagen als Feederzellen oder zellfreien Systemen hatte dies den Vorteil, dass die Stimulation in Gegenwart von annähernd physiologischen zellulären und löslichen Ko-Stimulatoren erfolgte. Die Stimulation der T-Zellen erfolgte polyklonal über lösliche monoklonale anti-CD3-Antikörper. Auf eine Ko-Stimulation mit anti-CD28-Antikörpern, wie sie häufig bei polyklonaler T-Zellaktivierung oder zellfreien Systemen (CD3/CD28 Beads) verwendet werden, wurde hier ebenfalls verzichtet. Es wurden anti-CD3-Klone *OKT3* sowie *UCHT1* getestet. Beide Antikörper wirken mitogen und stimulieren die Proliferation von T-Zellen. Im Suppressions-Test konnte sowohl mit *OKT3* (0,25 µg/ml) als auch mit *UCHT1* (1,25 µg/ml) nach 72 Stunden eine gute Stimulation der  $T_{EFF}$ -Zellen und dosisabhängige Suppressionsraten der  $T_{REGS}$  erzielt werden. Im Vergleich zu *UCHT1* wurden bei der Verwendung von *OKT3* effektivere Suppressionsraten beobachtet. Aufgrund dieses Ergebnisses als auch des Literaturbefundes, dass bei etwa 40 % der gesunden Spender mit *UCHT1* keine Proliferation der PBMCs induziert werden kann (Van Wauwe *et al.* 1984), wurden alle Suppressions-Tests mit dem Antikörper *OKT3* durchgeführt. Van Wauwe *et al.* (1984) vermuteten, dass der Unterschied auf die Immunglobulin-Klassen beider Antikörper zurückzuführen ist. Heute weiß man, dass Immunglobuline der Maus unterschiedlich gut an Fcγ-Rezeptoren (FcγR) des Menschen gebunden werden (Bruhns 2012). *OKT3* ist ein Maus IgG2 Antikörper und bindet gut an humane FcγR des Typ I (FcγRI; CD64), der auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert ist, während *UCHT1* ein IgG1 Antikörper ist und nicht an FcγRI bindet. Hierauf könnte die differentielle Stimulation der beiden Antikörper zurückzuführen sein.

Zur Messung der Zellproliferation im Suppressions-Test wurde den Kulturen nach drei Tagen polyklonaler Stimulation  $^3[H]$ -Thymidin hinzugefügt und für weitere 16 Stunden inkubiert. Alternativ kann die Proliferation mit CFSE-Test (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) bestimmt werden. Hierbei wird zu Beginn der Kultur ein Fluoreszenzfarbstoff (CFSE) in die Zellmembran inkorporiert und die Zellteilung anhand der Abnahme der Fluoreszenzintensität pro Zellzyklus bestimmt (Lyons & Parish 1994). Obgleich diese Methode zusätzliche Möglichkeiten bietet (Venken *et al.* 2007), kann der  $^3[H]$ -Thymidin

Standard-Proliferations-Test zur Messung der suppressiven Aktivität von nT<sub>REG</sub>-Zellen als ausreichend erachtet werden.

Funktionelle Analysen von humanen T<sub>REG</sub>-Subpopulationen sind aufgrund der geringen Anzahl von T<sub>REGS</sub> im peripheren Blut, nur begrenzt möglich. Die dosisabhängige suppressive Kapazität isolierter T<sub>REG</sub>-Zellpopulationen wurde gemessen, indem eine abnehmende Anzahl an T<sub>REGS</sub> mit einer konstanten Anzahl an T<sub>EFFS</sub> ko-kultiviert wurden, beginnend mit einem T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Verhältnis von 1:1. Für einen Suppressions-Test mit 50.000 Zellen pro Kultur wurden einschließlich der Kontrollen und Doppelbestimmungen 600.000 T<sub>EFFS</sub> und 387.500 T<sub>REGS</sub> benötigt. Bei der Verwendung von ca. 45 ml peripherem Blut wurde nach Negativselektion mittels MACS-Isolation eine durchschnittliche Ausbeute von  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen erhalten. Nach FACS-Isolation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen und weiterer Selektion in CD49d<sup>-</sup> bzw. CD49d<sup>+</sup> Subpopulationen konnten maximal 200.000 T<sub>REGS</sub> gewonnen werden. Die Mehrzahl der Analysen wurde deshalb mit *buffy-coats* anonymen, gesunder Spender durchgeführt.

Für die Kultivierung der T-Zellen im *in vitro* Suppressions-Test sind neben den Stimulationsbedingungen, das Kulturmedium und Serum von Bedeutung. Nach Etablierung des Suppressions-Tests wurde humanes AB-Serum „off the clot“ (Pool männlicher und weiblicher Spender) der Firma „PAA Laboratories“ verwendet. Obgleich T-Zellen nach polyklonaler Aktivierung in diesem Serum proliferierten, war die suppressive Aktivität der T<sub>REG</sub>-Zellen aufgehoben. Nachdem andere Variablen als Ursache ausgeschlossen waren, wurde dieses Serum im direkten Vergleich zu einem Serumpool von männlichen Spendern getestet. Es bestätigte sich, dass die Ursache der fehlenden Suppression auf die Charge des Serums zurückzuführen war. Anti-HLA-Antikörper im Serumpool dieser Charge, die auch Seren weiblicher Spender enthielt, konnten als Ursache ausgeschlossen werden. Die Charge wurde kürzlich vom Hersteller zurückgerufen, da es sich nicht um Serum handelte, sondern um Plasma, das nachträglich zur Gerinnung gebracht worden war. Ob in diesem Serum das Überleben oder die Aktivität der T<sub>REGS</sub> beeinträchtigt war oder ob nur *in vitro* aktivierte und schlechter suppressierbare T<sub>EFF</sub>-Zellen in diesem Serum aktiviert werden konnten, wurde nicht weiter untersucht.

## 4.2 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T<sub>REGS</sub>

Im Gegensatz zu Mäusen, bei denen nT<sub>REG</sub>-Zellen als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> definiert werden konnten, sind beim Menschen auch aktivierte T<sub>EFF</sub>-Zellen CD25 positiv, wenngleich die Expression geringer ist. FoxP3 ist als intrazellulärer Marker nicht für die Zellisolation und einen anschließenden funktionellen Test geeignet, weil die Zellen zur Markierung permeabilisiert werden müssten. Zur Überprüfung der Isolierungsmethode kann FoxP3 jedoch als T<sub>REG</sub>-Marker herangezogen werden. Bei der Isolation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen mittels MACS verbleiben CD25<sup>high</sup> und CD25<sup>intm</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen in der positiv selektionierten Fraktion, während sich CD25<sup>low</sup> und CD25<sup>-</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen in der negativ selektionierten Fraktion befinden. Bei der FACS-Sortierung hingegen werden in der Regel nur CD25<sup>high</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen sortiert, um eine Kontamination der T<sub>REG</sub>-Population mit CD25<sup>intm/low</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen zu vermeiden (Baecher-Allan *et al.* 2001). Eine Analyse der suppressiven Aktivität von MACS isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high/intm</sup> T<sub>REGS</sub> gegenüber CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-/low</sup> T<sub>EFFS</sub> war dosisabhängig und lag nach polyklonaler Aktivierung bei einem T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Verhältnis von 1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1 bei 66 % ± 4,4 %, 48 % ± 5,2 %, 39 % ± 3,1 % und 19 % ± 4,0 %. Diese Ergebnisse entsprechen den Literaturbefunden (Baecher-Allan *et al.* 2001; Dieckmann *et al.* 2001; Levings *et al.* 2001; Jonuleit *et al.* 2001, Shevach *et al.* 2001).

FACS sortierte CD25<sup>high</sup> T<sub>REGS</sub> hingegen sind in der Regel > 95 % FoxP3 positiv und supprimieren CD25<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub> stärker als CD25<sup>high/intm</sup> T<sub>REGS</sub> (Baecher-Allan *et al.* 2001). Weil eine klare Abgrenzung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>intm</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen schwierig und nur über FACS-Sortierung möglich ist, wurden Antikörper gegen weitere Zelloberflächenmarker verwendet um aktivierte T<sub>EFFS</sub> aus der T<sub>REG</sub>-Population zu entfernen. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine Subpopulation humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, CD127 (IL-7R α-Kette) nicht oder nur gering exprimieren, phänotypisch sind diese Zellen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup> und exprimieren zu 94 % FoxP3 (Liu *et al.* 2006; Seddiki *et al.* 2006; Hartigan-O'Connor *et al.* 2007; Klein *et al.* 2010). Diese Korrelation ist jedoch nicht absolut, da ein variabler Anteil der CD127<sup>+/bright</sup> Zellen nicht FoxP3 positiv ist und umgekehrt ein Anteil der CD127<sup>+/bright</sup> Zellen FoxP3 positiv ist. Es besteht am ehesten eine Korrelation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T<sub>REGS</sub> mit CD127<sup>-/low</sup> während CD25<sup>intm</sup> Zellen CD127<sup>high</sup> sind (Seddiki *et al.* 2006). Der Antikörper CD127 wurde bei weiteren Arbeiten bei der FACS-Sortierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen und der Sortierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen eingesetzt. Der CD127 Antikörper sollte hierbei zu einer besseren Abgrenzung der CD25<sup>high</sup> von CD25<sup>intm</sup> T<sub>REGS</sub> beitragen.

Bei der Verwendung von FACS isolierten  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low} T_{REGS}$  und  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die dosisabhängige Suppression bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1 bei 77 %, 56 %, 30 % und 11 % lag. Die effektivere Suppression der  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low} T_{REGS}$  gegenüber MACS isolierter  $CD4^+CD25^{high/intm} T_{REGS}$  ist jedoch nicht allein auf eine höhere suppressive Kapazität der  $CD25^{high} T_{REGS}$  zurückzuführen, sondern auch auf eine Heterogenität der  $T_{EFF}$ -Zellen. Eine Trennung von MACS isolierten  $CD4^+CD25^{-/low} T_{EFFS}$  in  $CD4^+CD25^{low} T_{EFFS}$  oder  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  mittels FACS-Sortierung und Analyse im Suppressions-Test zeigte, dass sich  $CD4^+CD25^{low} T_{EFFS}$  hingegen nur schlecht supprimieren ließen, 23 % bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 1:1 und 3 % bei einem Verhältnis von 0,5:1. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine variable Anzahl von  $CD4^+CD25^{low} T_{EFFS}$  die suppressive Kapazität von  $T_{REGS}$  entscheidend reduzieren kann. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit für weitere Analysen von  $T_{REGS}$  nur noch FACS isolierte  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  verwendet.

Eine Trennung von  $CD4^+CD25^{high} T_{REGS}$  in naive  $CD45RA^+$  sowie *memory*  $CD45RO^+$  T-Zellen zeigte, dass beide Populationen vergleichbare suppressive Aktivität aufweisen (Seddiki *et al.* 2006). Unter der Annahme, dass nicht alle  $FoxP3^+ T_{REGS}$  zur Suppression fähig sind, unterteilten Miyara *et al.* (2009)  $CD4^+FoxP3^+ T_{REGS}$  entsprechend ihrer unterschiedlichen hohen Expression von FoxP3 und CD45RA in drei unterschiedliche Subpopulationen: in naive  $CD4^+CD45RA^+FoxP3^{low} T_{REGS}$ , in aktivierte  $CD4^+CD45RA^-FoxP3^{high} T_{REGS}$  und in  $CD4^+CD45RA^-FoxP3^{low} T$ -Zellen (keine  $T_{REGS}$ ). Beide  $T_{REG}$ -Populationen, naive  $CD4^+CD45RA^+FoxP3^{low} T_{REGS}$  als auch aktivierte  $CD4^+CD45RA^-FoxP3^{high} T_{REGS}$  zeigten suppressive Aktivität. Die aktivierten  $CD45RA^- T_{REGS}$  exprimierten CD25 stärker als naive  $CD45RA^+ T_{REGS}$  (Miyara *et al.* 2009; Miyara *et al.* 2011).

In der Literatur wurde CD49d als  $T_{REG}$ -Zellmarker beschrieben, der proinflammatorische Effektorzellen von immunsuppressiven  $T_{REGS}$  unterscheiden soll. CD49d ist auf mehr als 80 % der humanen PBMCs vorhanden, darunter auch auf den nicht-regulatorischen  $CD4^+CD25^{low} T$ -Zellen sowie den Zytokin-sezernierenden  $CD4^+$  Effektorzellen. Die Depletion von CD49d und CD127 positiven T-Zellen resultierte in einer Subpopulation von  $T_{REGS}$  mit hoher FoxP3-Expression und höherer suppressiver Kapazität als vergleichbare  $CD49d^+ T_{REGS}$ . Kleinewietfeld *et al.* (2009) erzielten mit  $CD4^+CD49d^-CD127^- T_{REGS}$  eine Suppression von 77 % von  $CD4^+ T_{EFFS}$ , während die suppressive Aktivität der  $CD4^+CD49d^+CD127^- T_{REGS}$  bei nur 28 % lag. CD49d steht für die  $\alpha 4$ -Kette des Integrins VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ), einem Mitglied der Integrinfamilie, die zu der Gruppe von Adhäsionsmole-

külen zählt. Neben dem  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin bildet CD49d mit der  $\beta_7$  Kette das  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin. Etwa 15 % - 30 % der humanen  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen aus dem peripheren Blut exprimieren das  $\alpha_4\beta_7$  Integrin während der Hauptanteil der Zellen das  $\alpha_4\beta_1$  Integrin exprimiert (Stassen *et al.* 2004).

Die Verwendung von CD49d als Marker ist insofern interessant, da das Integrin auf T-Zellen aus dem peripheren Blut von MS-Patienten nach einem Schub hochreguliert ist (Soliu-Hänninen *et al.* 2005). Der humanisierte monoklonale Antikörper gegen die  $\alpha_4$ -Kette, auch als Natalizumab bekannt, wird erfolgreich zur Behandlung der schubförmig-verlaufenden MS eingesetzt (Kivisäkk *et al.* 2009). Natalizumab richtet sich gegen die  $\alpha_4$ -Kette (CD49d) und bindet somit an das  $\alpha_4\beta_1$  Integrin als auch das  $\alpha_4\beta_7$  Integrin (VLA-4). Es blockiert die Bindung der T-Zellen an VCAM-1 und das Einwandern aktivierter Lymphozyten ins ZNS. Hätten  $CD49d^+$   $T_{REGS}$  keine regulatorische Funktion, würde dies bedeuten, dass regulatorische Zellen zumindest über diesen Adhäsionsmechanismus nicht ins ZNS gelangen könnten.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^-$   $T_{REGS}$  bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 1:1 sehr hoch war ( $88 \% \pm 4,6 \%$ ). Im Vergleich hierzu war die suppressive Aktivität von T-Zellen, die den Marker CD49d exprimierten ( $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^+$ ) bei dem gleichen  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 1:1 ( $71 \% \pm 11,4 \%$ ) niedriger. Die Differenz zwischen diesen beiden  $T_{REG}$ -Populationen war jedoch weitaus geringer ( $77 \%$  versus  $28 \%$ ) als in der Publikation von Kleinewietfeld *et al.* (2009) angegeben. Während in meiner Arbeit  $CD4^+CD127^{-/low}$  T-Zellen vor der Trennung in  $CD49d^+$  und  $CD49d^-$  Zellen für  $CD25^{high}$  exprimierende  $T_{REGS}$  angereichert wurden, trennten diese Autoren  $CD4^+CD127^{-/low}$  T-Zellen direkt in  $CD49d^+$  und  $CD49d^-$  Zellen. Daraus ist zu schließen, dass die Korrelation von  $CD25^{high}$  exprimierenden  $T_{REGS}$  und  $CD49d^-$  stärker ist als die Korrelation von  $CD25^{high}$  exprimierenden  $T_{REGS}$  und  $CD49d^+$ .

Der zelluläre Oberflächenmarker CD39 wurde als weitere Alternative zur Isolation von  $nT_{REGS}$  beschrieben (Borsellino *et al.* 2007; Deaglio *et al.* 2007, Mandapathil *et al.* 2009; Schuler *et al.* 2011). CD39 ist ein Aktivierungsmarker und eine Ektonukleotidase, die perizelluläres Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) hydrolysiert (Borsellino *et al.* 2007). CD73 wandelt AMP in Adenosin um, welches antiinflammatorisch wirkt. Die Anzahl von  $CD4^+CD39^+$   $T_{REGS}$  ist in humanen PBMCs deutlich höher als die Anzahl von  $CD4^+CD25^{high}$   $T_{REGS}$  ( $5 \%$  versus  $1 \%$ ) (Schuler *et al.* 2011). Ein Vergleich der suppressiven Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}$   $T_{REG}$ -Zellen mit



CD4<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zellen zeigte eine Suppression von 33 % und 36 % bei einem T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Verhältnis von 1:1 (Mandapathil *et al.* 2009). Schuler *et al.* (2011) isolierten CD4<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> mit einem kommerziell erhältlichen Biotin-konjugierten anti-CD39 Antikörper in Kombination mit magnetischen Beads, an welche ein anti-Biotin Antikörper gekoppelt war. Bei einem T<sub>REG</sub> : T<sub>EFF</sub> Verhältnis von 1:1 zeigten die CD4<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> eine suppressive Aktivität von 45 %. Als CD4<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen wurden CD4<sup>+</sup>T<sub>EFFS</sub> eingesetzt, die nicht weiter aufgereinigt waren. Wie zuvor diskutiert, zeigen eigene Daten, dass ein hoher Anteil von CD25<sup>low</sup> Zellen die suppressive Kapazität von T<sub>REG</sub>-Zellen einschränken können. Dies könnte die Ursache für die vergleichsweise niedrige suppressive Aktivität sein.

Die Kombination verschiedener Antikörper zur Oberflächencharakterisierung ergab ein komplexes Bild von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup> sowie CD4<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub>-Zell Populationen. Von den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T<sub>REGS</sub> exprimieren 95 % FoxP3 und 70 % CD39, von den CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> exprimieren 47 % FoxP3<sup>+</sup>, 10 % CD39 und 52 % CD25. Von den CD4<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> sind 13 % FoxP3<sup>+</sup>, 7 % CD39<sup>+</sup> und 10 % CD25<sup>+</sup> während von den CD4<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> 89 % FoxP3 exprimieren. Zusammengefasst implizieren diese Daten zwei unterschiedliche Subpopulationen: CD4<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub>, die außerdem FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD49d<sup>-</sup> sind und suppressive Aktivität aufweisen sowie CD4<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen, die außerdem FoxP3<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup> sind und keine suppressive Aktivität zeigen (Schuler *et al.* 2011). Hieraus ergibt sich, dass die phänotypische Charakterisierung von T<sub>REGS</sub> über eine Anreicherung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> und Depletion von CD127 und CD49d, wie sie in meiner Arbeit verwendet wurde, eine bessere Methode ist, um T<sub>REGS</sub> mit hoher suppressiver Kapazität zu isolieren.

### 4.3 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T<sub>EFFS</sub>

Die Kontrolle von potentiell autoreaktiven T-Zellen *in vivo* ist für die Immunhomöostase und Schutz vor Autoimmunerkrankungen unerlässlich. Dies ist eindrücklich belegt durch das Fehlen von natürlichen regulatorischen T-Zellen beim IPEX-Syndrom des Menschen und der „scurfy Maus“ (Bennet *et al.* 2001; Brunkow *et al.* 2001). Die Vermutung, dass auch bei komplexen Autoimmunerkrankungen des Menschen Anzahl oder funktionelle Aktivität von T<sub>REGS</sub> beeinträchtigt sein könnten, lag daher nahe. Eine Regulation von autoreaktiven T-Zellen durch T<sub>REGS</sub> ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Mausmodellen für verschiedene Autoimmunerkrankungen untersucht worden.

Beim Menschen beinhalten die publizierten Daten hauptsächlich relative Häufigkeiten von  $T_{REGS}$  des Patienten gegenüber gesunden Spendern sowie die Analyse der suppressiven Kapazität von  $T_{REGS}$ . In der Regel basieren die *in vitro* Suppressions-Tests auf Ko-Kulturen von  $T_{REGS}$  und PBMCs,  $CD4^+$  T-Zellen oder  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen als Effektorzellen. Studien zu einer unterschiedlichen Supprimierbarkeit der Effektorzellen von Patienten und gesunden Spendern gibt es kaum, vielmehr wird von einer unterschiedlichen suppressiven Kapazität der  $T_{REGS}$  ausgegangen. In meinem Projekt wurde deshalb u. a. die Heterogenität von Effektorzellpopulationen und ihre Supprimierbarkeit durch  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^-$  oder  $CD49d^+$   $T_{REGS}$  untersucht.

Zunächst zeigte sich, dass FACS isolierte  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low} T_{REGS}$   $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  gut supprimierten, während  $CD4^+CD25^{low} T_{EFFS}$  schlecht supprimiert wurden. Die Suppression betrug bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 1:1, 77 % *versus* 23 % und bei einem Verhältnis von 0,5:1, 56 % *versus* 23 %. Bei MACS Isolation gegenüber FACS Isolation beträgt der durchschnittliche Anteil an  $CD4^+CD25^{low} T_{EFFS}$  an der Gesamtpopulation der  $CD4^+CD25^{-/low}$  T-Zellen etwa 23 %. Das Ergebnis wurde bestätigt, wenn zur Isolation zusätzlich der Oberflächenmarker CD127 verwendet wurde und  $CD4^+CD25^-CD127^+$  *versus*  $CD4^+CD25^{low}CD127^+$  isolierte  $T_{EFF}$ -Subpopulationen zusammen mit  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low} T_{REGS}$  ko-kultiviert wurden. Ursache könnte ein unterschiedlicher Aktivierungsgrad sowie eine unterschiedliche IL-2 Produktion der beiden Zellpopulationen sein. Jana *et al.* (2010) hatten ebenfalls gezeigt, dass  $CD4^+CD25^{low} T_{EFFS}$  schlechter supprimiert wurden als  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$ . Weiterhin zeigten sie, dass  $CD4^+CD25^{low}$  gegenüber  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen eher aktivierten Zellen entsprechen. Die  $CD4^+CD25^{low}$  Zellen proliferieren stärker, der Anteil an CD45RO Zellen war wesentlich höher (> 70 %) und sie produzierten mehr IFN- $\gamma$  als  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass  $CD4^+CD25^{low}$ , entsprechend ihrem höheren Aktivierungsgrad, insbesondere zu Kulturbeginn mehr IL-2 produzierten. Es ist bekannt, dass die Differenzierung, Proliferation und Suppressorfunktion von  $T_{REGS}$  von der IL-2 Produktion anderer T-Zellen abhängig ist (Setoguchi *et al.* 2005) und das  $T_{REGS}$  einerseits zur Suppression von  $T_{EFFS}$  IL-2 benötigen und andererseits die Transkription von IL-2 und IL-4 in Effektorzellen inhibieren (Thornton *et al.* 2004). So könnten Zeitpunkt und Menge der IL-2 Produktion die unterschiedliche Supprimierbarkeit der  $T_{EFF}$ -Zellen bestimmen.

Aus den ersten Ergebnissen meiner Arbeit ergab sich die Frage, ob die  $CD4^+CD25^- T_{EFF}$ -Zellpopulation gegenüber der  $CD4^+CD25^{low} T_{EFF}$ -Zellpopulation eventuell einen geringeren Anteil an bereits *in vivo* aktivierten CD45RA $^-$  T-Zellen enthält und ob sich bereits *in vivo* aktivierte  $T_{EFF}$ -Zellen schlechter supprimieren lassen als naive  $T_{EFF}^-$

Zellen. Im nächsten Schritt wurden deshalb  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  in  $CD45RA^+$  und  $CD45RA^-$  Effektorzellpopulationen getrennt und die suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high} T_{REGS}$  gegenüber den drei unterschiedlichen Effektorzellpopulationen bestimmt.  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  ließen sich gegenüber  $CD4^+CD25^-CD45RA^- T_{EFFS}$  etwas besser supprimieren, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.  $CD4^+CD25^-CD45RA^+ T_{EFFS}$  hingegen ließen sich insbesondere bei geringen  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnissen signifikant besser supprimieren. Bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 0,25:1, betrug die Suppression 79 % *versus* 48 % und bei einem Verhältnis von 0,125:1, 52 % *versus* 20 %. Die Einteilung in naive  $CD45RA^+$  und „memory“  $CD45RO$  T-Zellen ist hier etwas vereinfacht, da sowohl *in vivo* (Michie *et al.* 1992) als auch *in vitro* (Geginat *et al.* 2001) gezeigt wurde, das  $CD45RO$  T-Zellen  $CD45RA^+$  erneut exprimieren können. Im Vergleich zu den Befunden von Jana *et al.* (2010) zeigte sich, dass die Vermutung, das  $CD4^+CD25^{low} T_{EFFS}$  gegenüber  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  mehr aktivierte T-Zellen enthält, richtig war. Jana *et al.* fanden, dass in der  $CD4^+CD25^{low}$  Zellpopulation etwa 70 % der Zellen  $CD45RO^+$  waren, während in der  $CD4^+CD25^-$  Zellpopulation etwa 75 %  $CD45RA^+$  waren. Meine Arbeit zeigt jedoch, dass die unterschiedliche Supprimierbarkeit der beiden Effektorzellpopulationen nicht von der CD25 Expression abhängig war sondern vielmehr von dem Aktivierungsstatus, da sich innerhalb der  $CD4^+CD25^-$  T-Zellpopulation  $RA^+$  Zellen besser supprimieren ließen als  $RA^-$  Zellen.

Bei der Analyse von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^-$  *versus*  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^+ T_{REGS}$  gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+ T_{EFFS}$  war die durchschnittliche suppressive Kapazität der  $CD49d^- T_{REGS}$  höher als die der  $CD49d^+ T_{REGS}$ . Die interindividuelle Schwankungsbreite war jedoch sehr viel höher als zunächst erwartet. Bei der Hälfte der Spender zeigten  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 0,5:1 eine suppressive Aktivität von 82 % – 91 % gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+ T_{EFFS}$ , während die Suppressionsraten der anderen Spender mit 59 % bzw. 50 % ( $p = 0,0068$ ) und 36 % bzw. 20 % ( $p = 0,0036$ ) signifikant hiervon abweichen.

In weiteren Experimenten wurde die suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  und  $CD49d^+ T_{REGS}$  jeweils gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+ T_{EFFS}$  und  $CD45RA^- T_{EFFS}$  untersucht. Nun zeigte sich, dass die suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+ T_{EFFS}$  bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 0,5:1 kaum interindividuelle Schwankungen zeigten (Suppression zwischen 81 % und 91 %), lediglich bei einem Spender war der Suppressionswert mit 63 % geringer. Bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Ver-

hältnis von 1:1 war die Suppression hingegen vergleichbar mit der suppressiven Aktivität der  $T_{REGS}$  der anderen Spender. Diese Untersuchung zeigt noch einmal sehr eindrücklich, dass die suppressive Aktivität von  $T_{REGS}$  sehr stark abhängig ist von der verwendeten Effektorzellpopulation.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die suppressive Kapazität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  höher ist als die von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^+ T_{REGS}$  und dass  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+ T_{EFFS}$  sich besser supprimieren lassen als  $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^- T_{EFFS}$ . Hieraus ergibt sich folgende Hierarchie von  $T_{REG}$  und  $T_{EFF}$  Kombinationen mit Angabe der Suppressionswerte bei einem  $T_{REG} : T_{EFF}$  Verhältnis von 0,5:1.  $CD49d^- T_{REGS}$  gegenüber  $RA^+ T_{EFFS}$  (82 %) >  $CD49d^+ T_{REGS}$  gegenüber  $RA^+ T_{EFFS}$  (66 %) >  $CD49d^- T_{REGS}$  gegenüber  $RA^- T_{EFFS}$  (51 %) >  $CD49d^+ T_{REGS}$  gegenüber  $RA^- T_{EFFS}$  (29 %).

Im Hinblick auf diese Befunde, müssen publizierte Daten zur suppressiven Kapazität von  $T_{REG}$ -Zellen bei Autoimmunerkrankungen differenziert betrachtet werden. In den meisten Publikationen blieb die Frage der Suppressierbarkeit der Effektorzellen von Patienten und/oder gesunden Spendern außer Betracht (Baecher-Allan *et al.* 2001; Jonuleit *et al.* 2001; Viglietta *et al.* 2004, Baecher-Allan *et al.* 2005; Haas *et al.* 2005, Kumar *et al.* 2006; Liu *et al.* 2006; Seddiki *et al.* 2006; Deaglio *et al.* 2007; Venken *et al.* 2008).

In neueren Studien wurde bei den Autoimmunerkrankungen SLE (Venigalla *et al.* 2008), T1D (Schneider *et al.* 2008) und RA (Xiao *et al.* 2011) eine eingeschränkte Suppressierbarkeit von  $T_{EFF}$ -Zellen beschrieben. Die Autoren führten *cross-over* Experimente durch und zeigten, dass  $T_{REGS}$  der Patienten autologe  $T_{EFFS}$  wesentlich schlechter supprimieren konnten als allogene  $T_{EFFS}$  gesunder Spender und *vice versa*. In den Arbeiten von Venigalla *et al.* und Schneider *et al.* wurden die Effektorzellen nicht weiter charakterisiert. Xiao *et al.* hingegen zeigten, dass stimulierte Effektorzellen von RA-Patienten wesentlich mehr TRAIL<sup>+</sup> Zellen enthielten, als Effektoren gesunder Probanden. Weiterhin zeigten sie, dass eine geringere Suppressierbarkeit der Effektorzellen der Patienten gegenüber gesunden Probanden durch die Zugabe von anti-TRAIL Antikörpern reduziert werden konnte. Eine Untersuchung bezüglich  $CD4^+CD25^{low}$  versus  $CD4^+CD25^-$  oder  $CD4^+CD25^-RA^+$  versus  $CD4^+CD25^-RA^- T_{EFF}$ -Zellen wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht durchgeführt. In der Arbeit von Schneider *et al.* (2013) wurden induzierte  $T_{REGS}$  ( $CD4^+CD25^{high}$ ) gesunder Spender verwendet, um die Suppressierbarkeit der Effektorzellen von Patienten mit schubförmiger MS zu vergleichen mit der Suppressierbarkeit von Effektorzellen gesunder Probanden. Sie zeigten, dass sich die  $CD4^+CD25^-$  Effektorzellen von Patienten im aktiven Stadium schlechter supprimieren ließen, als von Patienten in Remission oder mit einem rela-

tiv milden Verlauf und diese wiederum schlechter als Effektorzellen gesunder Spender. Weiterhin zeigten sie, dass Effektorzellen von Patienten gegenüber Kontrollen in Gegenwart von IL-6 eine geringere Suppression zeigten und dies mit einer höheren Expression von STAT3 korrelierte. Die STAT3 Expression korrelierte wiederum mit der Expression von IL6R $\alpha$  auf den Effektorzellen. Eine Resistenz von IL-6 und TNF- $\alpha$  produzierenden T-Effektorzellen gegenüber FoxP3<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> wurde nach antigenspezifischer Stimulation auch im EAE-Mausmodell beschrieben. Während naive MOG-spezifische T-Zellen supprimiert werden konnten, ließen sich *in vivo* aktivierte enzephalitogene T-Zellen nicht supprimieren (Korn *et al.* 2007).

#### 4.4 Regulatorische T-Zellen in der klinischen Anwendung

Der adoptive Transfer von T<sub>REG</sub>-Zellen ist eine vielversprechende Option für die Prävention und Behandlung von T-Zell-vermittelten Erkrankungen (Brusko *et al.* 2008; June & Blazar 2006; Hoffmann & Edinger 2006). In Tiermodellen war der adoptive Transfer von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> erfolgreich, um Autoimmunerkrankungen wie dem T1D (Szanya *et al.* 2002; Tang *et al.* 2004) und der EAE (Rouse *et al.* 2013, Furtado *et al.* 2001) vorzubeugen. Bei der experimentell induzierten Kolitis (Mottet *et al.* 2003) und Arthritis (Morgan *et al.* 2005) nahmen die Symptome nach Transfer von T<sub>REGS</sub> wieder ab.

Daher liegt es nahe, dass T<sub>REGS</sub> auch zur Therapie von Erkrankungen beim Menschen eingesetzt werden können. Eine erste erfolgreiche Anwendung von T<sub>REGS</sub> zur Vermeidung einer Transplantat gegen Wirt Erkrankung (*graft versus host disease*; GVHD) nach haploidenter Stammzelltransplantation beim Menschen wurde bereits beschrieben (Di Ianni *et al.* 2011). Die klinische Anwendung zur Therapie von Autoimmunerkrankungen beim Menschen ist jedoch weitaus schwieriger, weil eine höhere Anzahl von T<sub>REGS</sub> erforderlich sein wird um bereits aktivierte autoreaktive T-Zellen zu supprimieren. Hierzu müssten die T<sub>REG</sub>-Zellen zuvor *in vitro* expandiert werden. Das erfordert jedoch die Identifizierung und Isolation einer reinen T<sub>REG</sub>-Population aus dem peripheren Blut und eine Kontamination mit autoreaktiven Effektorzellen und konventionellen CD4<sup>+</sup> Zellen, die *in vitro* einen Wachstumsvorteil haben, muss vermieden werden.

In dieser Arbeit konnte mittels FACS-Isolation eine Population an reinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-low</sup>CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> gewonnen werden, die im Suppressions-Test nach polyklonaler Aktivierung auch die Proliferation von allogenen Effektorzellen supprimierten (Kapitel 3.4.3). Dabei wurden die T<sub>REGS</sub> aus dem *buffy-coat* eines Spenders isoliert, wäh-

rend die  $T_{\text{EFFS}}$  aus peripherem Blut gewonnen wurden. Die Suppression der  $CD45RA^+ T_{\text{EFFS}}$  lag bei 93 % und bestätigt somit, dass allogene  $T_{\text{REGS}}$  ihre funktionelle Aktivität auch gegenüber fremden Effektorzellen beibehalten. Ein Nachteil dieser hoch aufgereinigten  $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{-\text{low}}CD49d^- T_{\text{REGS}}$  ist, dass sie nur in sehr geringer Anzahl im peripheren Blut vorkommen. Eine *in vitro* Expansion von  $T_{\text{REGS}}$  ist für die Gewinnung von ausreichenden Zellzahlen für die erste und gegebenenfalls weitere  $T_{\text{REG}}$  Behandlungen von Autoimmunerkrankungen notwendig.

Verschiedene Studien zu humanen  $T_{\text{REGS}}$  haben gezeigt, dass die Expansion von aufgereinigten  $CD4^+CD25^+ T_{\text{REGS}}$  in Ko-Kulturen mit DCs (Jiang *et al.* 2003), B-Zellen (Chen *et al.* 2009) oder anti-CD3/CD28 Microbeads (Earle *et al.* 2005; Hoffmann *et al.* 2004) möglich ist. Diese Protokolle erlauben eine Anreicherung um ein Vielfaches (200-300x) innerhalb eines Zeitraums von 3-4 Wochen. Zur *in vitro* Expansion benötigen  $T_{\text{REGS}}$  eine starke TCR-Stimulation sowie kostimulierende Faktoren und hohe Konzentrationen von exogenem IL-2 (Schmetterer *et al.* 2012). In allen Studien blieb die suppressive Funktion der  $CD4^+CD25^+ T_{\text{REGS}}$  nach der Expansion erhalten.

Bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen mit  $T_{\text{REGS}}$  stellt sich jedoch auch die Frage, welche Patienten zu therapieren sind. Sollten es die Patienten sein, deren Anzahl an  $T_{\text{REGS}}$  erniedrigt ist oder diejenigen, deren  $T_{\text{REGS}}$  eine geringere suppressive Kapazität aufweisen? In diesem Fall wären zunächst die diagnostischen Kriterien festzulegen. In meiner Arbeit als auch in anderen (Kleinewietfeld *et al.* 2009; Schuler *et al.* 2011) wurde gezeigt, dass die  $T_{\text{REG}}$ -Zellpopulation heterogen ist und unterschiedliche suppressive Kapazität aufweist, diese wäre bei der Bestimmung der Anzahl an  $T_{\text{REGS}}$  zu berücksichtigen. Weiterhin wurde in meiner Arbeit und in anderen (Venigalla *et al.* 2008; Schneider *et al.* 2008; Jana *et al.* 2010; Xiao *et al.* 2011) gezeigt, dass die  $T_{\text{EFF}}$ -Population von Spender zu Spender variiert und der Anteil an aktivierten  $T_{\text{EFF}}$ -Zellen das Ergebnis des Suppressions-Tests entscheidend bestimmt.

Wie schwierig es ist, die Defizienz von  $T_{\text{REGS}}$  bei Autoimmunerkrankungen zu erfassen, zeigen die publizierten Daten. Beispielsweise wurden bei Patienten mit SLE eine geringere Anzahl von  $T_{\text{REGS}}$  gemessen (Liu *et al.* 2004) als auch eine verminderte Sensitivität von  $CD4^+CD25^- T_{\text{EFFS}}$  gegenüber  $CD4^+CD25^{\text{high}}$  und  $CD127^{-\text{low}} T_{\text{REGS}}$  beobachtet (Venigalla *et al.* 2008). Bei MS hingegen wurde eine verminderte suppressive Aktivität der  $T_{\text{REGS}}$  beschrieben und bei dem T1D vorwiegend eine Resistenz der  $T_{\text{EFFS}}$  gegenüber  $T_{\text{REGS}}$ . Eine Resistenz der  $T_{\text{EFF}}$ -Zellen gegenüber  $T_{\text{REGS}}$  wurde kürzlich auch bei MS-Patienten beobachtet (Schneider *et al.* 2013).

Neben der diagnostischen Frage, ist noch völlig offen, ob bereits aktivierte autoreaktive  $T_{\text{EFFS}}$  bei einer manifesten Autoimmunerkrankung noch supprimiert werden können. Meine Arbeit zeigt, dass die suppressive Aktivität von  $T_{\text{REGS}}$  von den zu supprimierenden  $T_{\text{EFFS}}$  abhängig ist.  $CD4^+CD25^{\text{low}} T_{\text{EFFS}}$  können im Vergleich zu  $CD4^+CD25^- T_{\text{EFFS}}$  (77 %) nur zu 23 % supprimiert werden. In der  $CD4^+CD25^- T_{\text{EFF}}$  Population lassen sich aktivierte  $CD45RA^- T_{\text{EFFS}}$  grundsätzlich sehr viel schlechter supprimieren als  $CD45RA^- T_{\text{EFFS}}$ .

Für die Expansion von  $T_{\text{REGS}}$  müssten die Protokolle optimiert werden. Die Verwendung von Zytokinen (IL-7, IL-15) (Koenen *et al.* 2003; Chen *et al.* 2006), ko-stimulierenden Faktoren (4-1BBL) (Elpek *et al.* 2007) oder pharmakologischen Zusätzen (Dexamethason) (Chen *et al.* 2006) sind in der Literatur beschrieben. Jedes Protokoll birgt bestimmte Vor- und Nachteile. Obwohl die Messung der suppressiven Aktivität *in vitro* nicht unbedingt eine 100% ige Reinheit der  $nT_{\text{REGS}}$  erfordert, stellen kontaminierende  $T_{\text{EFFS}}$  ein ernst zunehmendes Hindernis für den adoptiven Transfer in den Patienten dar.

Aufgrund unterschiedlicher Subpopulationen von  $T_{\text{REGS}}$  ist denkbar, dass therapeutische Anwendungen auch spezielle  $T_{\text{REG}}$ -Subpopulationen erfordern. Eine andere Herausforderung für die klinische Anwendung von  $T_{\text{REGS}}$  ist ihre Antigen-Spezifität. Murine Tiermodelle für Autoimmunerkrankungen (Tang *et al.* 2004; Lüth *et al.* 2008) haben gezeigt, dass Antigen-spezifische  $T_{\text{REGS}}$  für die Therapie besser geeignet sind als polyklonal aktivierte  $T_{\text{REGS}}$ .

Obgleich die tierexperimentellen Daten zur Anwendung von Tregs bei Autoimmunität vielversprechend sind, besteht zur Anwendung beim Menschen noch viel Klärungsbedarf. Vielversprechend hingegen ist die Anwendung von  $T_{\text{REGS}}$  zur Vermeidung einer GVHD bei haploidenter Stammzelltransplantation (Di Ianni *et al.* 2011) bei der nicht expandierte  $T_{\text{REGS}}$  (Di Ianni *et al.* 2011) oder *in vitro* expandierte allogene (Trzonkowski *et al.* 2009; Brunstein *et al.* 2011)  $T_{\text{REGS}}$  erfolgreich verwendet wurden.

## 4.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass humane  $nT_{\text{REGS}}$  ( $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{-/\text{low}}$ ), depletiert für kontaminierende Effektorzellen ( $CD25^{\text{int/low}}$ ,  $CD127^+$ ) und positiv selektioniert für  $CD25^{\text{high}} T_{\text{REGS}}$  zwei Zellpopulationen aufweisen,  $CD49d^-$  und  $CD49d^+$ . Die  $CD49d^- T_{\text{REGS}}$  weisen gegenüber gleichen Effektorzellpopulationen eine höhere suppressive Kapazität auf als die  $CD49d^+ T_{\text{REGS}}$ . Die suppressive Kapazität sowohl der

CD49d<sup>-</sup> T<sub>REGS</sub> als auch der CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> ist unmittelbar abhängig von den angebotenen Effektorzellen im Suppressionstest. CD45RA<sup>+</sup> Effektorzellen lassen sich wesentlich besser supprimieren als CD45RA<sup>-</sup> Testzellen. Die Testzellen nehmen somit einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis des Suppressionstests. Das zeigt sich insbesondere daran, dass sich die Variationsbreite suppressiver Kapazität von T<sub>REGS</sub> innerhalb einer Gruppe gesunder Spender signifikant verringert, wenn nur CD45RA<sup>-</sup> T<sub>EFF</sub>-Zellen verwendet werden. Ursache hierfür ist sicherlich der Aktivierungsstatus des Immunsystems individueller Spender zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Hieraus folgt: eine verminderte suppressive Kapazität von T<sub>REG</sub>-Zellen von Patienten gegenüber gesunden Probanden ist nur dann bestätigt, wenn die T<sub>REG</sub>-Zellen auf einer definierten Effektorzellpopulation getestet wurden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die eingeschränkte suppressive Aktivität auf einen unterschiedlichen Anteil an CD49d<sup>-</sup> und CD49d<sup>+</sup> T<sub>REGS</sub> zurückzuführen sein kann. Soll die Supprimierbarkeit von Effektorzellen bestimmt werden, so sollten CD45RA<sup>+</sup> und CD45RA<sup>-</sup> T<sub>EFFS</sub> separat getestet werden oder vorzugsweise CD45RA<sup>-</sup> Zellen verwendet werden.



## 5 Zusammenfassung

Humane regulatorische T-Zellen ( $T_{REGS}$ ) stehen im Fokus immunologischer Forschung, da ihre klinische Anwendung ein großes Potential für die Prävention und Remission von Autoimmunerkrankungen und für die Prävention von Abstoßungsreaktionen bei allogenen Transplantationen aufweist. Informationen ob numerische und/oder funktionelle Verluste von  $nT_{REGS}$  zur Autoimmunität führen sind derzeit noch widersprüchlich. Direkte Vergleiche von gesunden Probanden und Patienten mit Autoimmunerkrankungen dokumentieren, dass in der Gruppe der Patienten häufiger Defizite der  $T_{REGS}$  vorliegen. Diese werden eher in der suppressiven Aktivität als in der Anzahl der  $T_{REGS}$  gesehen. Allerdings liegt bei einem hohen Anteil der Patienten die Anzahl und Funktion der  $T_{REGS}$  in einem gleichen, großen Schwankungsbereich, der auch bei den gesunden Probanden gemessen wird. Insgesamt weisen die Literaturbefunde darauf hin, dass sowohl die Gruppe der  $T_{REGS}$  als auch die der Effektor T-Zellen ( $T_{EFFS}$ ) heterogen ist. Ziel meiner Arbeit war daher die phänotypische und funktionelle Heterogenität der  $T_{REGS}$  als auch  $T_{EFF}$ -Zellpopulationen zu untersuchen.

Meine Arbeit zeigt, dass die suppressive Aktivität der  $T_{REGS}$  von der verwendeten  $T_{EFF}$ -Zellpopulation abhängig ist. Im Suppressions-Test wurden  $CD4^+CD25^{low} T_{EFFS}$  im Vergleich zu  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  kaum supprimiert. Eine variable Anzahl von  $CD4^+CD25^{low} T_{EFFS}$  reduziert entscheidend die suppressive Kapazität der  $T_{REGS}$ . Es konnte eindrücklich gezeigt werden, dass die Supprimierbarkeit der  $T_{EFF}$ -Zellen von ihrem Aktivierungsstatus abhängig ist. Werden  $CD4^+CD25^- T_{EFFS}$  in aktivierte  $CD45RA^-$  und naive  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  getrennt, so wird ersichtlich, dass sich naive  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  deutlich besser supprimieren lassen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die phänotypische Charakterisierung von  $T_{REGS}$  über  $CD4^+CD25^{high}$ ,  $CD127^{-/low}$  und  $CD49d^-$  eine ausgezeichnete Methode ist, um  $T_{REGS}$  mit hoher suppressiver Kapazität zu isolieren. Die funktionelle Analyse zeigte, dass die suppressive Kapazität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^-$  im Vergleich zu  $T_{REGS}$ , die den Marker  $CD49d$  exprimieren, signifikant höher war. Die funktionelle Kapazität von  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  gegenüber  $CD4^+CD25^-CD127^+$  war innerhalb einer Gruppe gesunder Spender sehr heterogen. Wurden jedoch  $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}CD49d^- T_{REGS}$  gegenüber naiven  $CD45RA^+ T_{EFFS}$  getestet, so lag die suppressive Aktivität der  $T_{REGS}$  aller Spender in einem sehr geringen Schwankungsbereich. Meine Arbeit zeigt, dass zur Beurteilung funktioneller Defizite von  $T_{REGS}$  eine standardisierte  $T_{EFF}$ -Zellpopulation notwendig ist. Weiterhin zeigt sie, dass bei standardisierten Zellen ( $CD4^+CD25^-CD127^+CD45RA^+$ )  $CD49d^- T_{REGS}$  eine höhere suppressive Kapazität aufweisen als  $CD49d^+ T_{REGS}$ .

## 6 Literaturverzeichnis

1. Afkarian, M., Sedy, JR., Yang, J., Jacobson, NG., Cereb, N., Yang, SY., Murphy, TL., Murphy, KM. (2002): T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 3, 549-57.
2. Akbar, AN., Terry, L., Timms, A., Beverley, PC., Janossy, G. (1988): Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J. Immunol.* 140, 2171-8.
3. Allan, SE., Broady, R., Gregori, S., Himmel, ME., Locke, N., Roncarolo, MG., Bacchetta, R., Levings, MK. (2008): CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol. Rev.* 223, 391-421.
4. Angus, KL., Griffiths, GM., (2013): Cell polarisation and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 85-91.
5. Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., Sakaguchi, S. (1996): Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* 184, 387-96.
6. Baecher-Allan, C., Brown, JA., Freeman, GJ., Hafler, DA. (2001): CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 167, 1245-53.
7. Baecher-Allan, C., Wolf, E., Hafler, DA. (2005): Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+ CD25+ T cells. *Clin. Immunol.* 115, 10-18.
8. Baecher-Allan, C., Wolf, E., Hafler, DA. (2006): MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J. Immunol.* 176, 4622-31.
9. Bardel, E., Larousserie, F., Charlot-Rabiega, P., Coulomb-L'Herminé, A., Devergne, O. (2008): Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J. Immunol.* 181, 6898-05.
10. Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., Horejs-Hoeck, J., Kaupper, T., Roncarolo, MG. (2006): Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J. Immunol.* 177, 8338-47.
11. Beissert, S., Schwarz, A., Schwarz, T. (2006): Regulatory T cells. *J. Invest. Dermatol.* 126, 15-24.
12. Bennett, CL., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, ME., Ferguson, PJ., Whitesell, L., Kelly, TE., Saulsbury, FT., Chance, PF., Ochs, HD. (2001): The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20-21.
13. Birnbaum, ME., Dong, S., Garcia, KC. (2012): Diversity-oriented approaches for interrogating T-cell receptor repertoire, ligand recognition, and function. *Immunol. Rev.* 250, 82-101.
14. Boissier, MC., Assier, E., Falgarone, G., Bessis, N. (2008): Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 75, 373-5.
15. Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, MC., Steinman, RM. (2002): Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 196, 1627-38.
16. Bopp, T., Dehzad, N., Reuter, S., Klein, M., Ullrich, N., Stassen, M., Schild, H., Buhl, R., Schmitt, E., Taube, C. (2009): Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression. *J. Immunol.* 182, 4017-24.
17. Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, ML., Rossini, PM., Battistini, L., Röttschke, O., Falk, K. (2007): Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 110, 1225-32.

18. Brucklacher-Waldert, V., Stuermer, K., Kolster, M., Wolthausen, J., Tolosa, E. (2009): Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*. 132, 3329-41.
19. Bruhns, P. (2012): Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 119, 5640-9.
20. Brunkow, ME., Jeffery, EW., Hjerrild, KA., Paepfer, B., Clark, LB., Yasayko, SA., Wilkinson, JE., Galas, D., Ziegler, SF., Ramsdell, F. (2001): Disruption of a new fork-head/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68-73.
21. Brunstein, CG., Miller, JS., Cao, Q., McKenna, DH., Hippen, KL., Curtsinger, J., De-  
for, T., Levine, BL., June, CH., Rubinstein, P., McGlave, PB., Blazar, BR., Wagner, JE. (2011): Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 117, 1061-70.
22. Brusko, T., Wasserfall, C., McGrail, K., Schatz, R., Viener, HL., Schatz, D., Haller, M., Rockell, J., Gottlieb, P., Clare-Salzler, M., Atkinson, M. (2007): No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 56, 604-12.
23. Brusko, TM., Putnam, AL., Bluestone, JA. (2008): Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol. Rev.* 223, 371-90.
24. Cao, D., van Vollenhoven, R., Klareskog, L., Trollmo, C., Malmström, V. (2004): CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.* 6, R335-46.
25. Capalbo, D., Giardino, G., Martino, LD., Palamaro, L., Romano, R., Gallo, V., Cirillo, E., Salerno, M., Pignata, C. (2012): Genetic basis of altered central tolerance and autoimmune diseases: a lesson from AIRE mutations. *Int. Rev. Immunol.* 31, 344-62.
26. Carlens, S., Gilljam, M., Remberger, M., Aschan, J., Christensson, B., Dilber, MS. (2000): Ex vivo T lymphocyte expansion for retroviral transduction: influence of serum-free media on variations in cell expansion rates and lymphocyte subset distribution. *Exp. Hematol.* 28, 1137-46.
27. Carroll, MV., Sim, RB. (2011): Complement in health and disease. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 63, 965-75.
28. Cerutti, A., Puga, I., Cols, M. (2012): New helping friends for B cells. *Eur. J. Immunol.* 42, 1956-68.
29. Chen, HW., Liao, CH., Ying, C., Chang, CJ., Lin, CM. (2006): Ex vivo expansion of dendritic-cell-activated antigen-specific CD4+ T cells with anti-CD3/CD28, interleukin-7, and interleukin-15: potential for adoptive T cell immunotherapy. *Clin. Immunol.* 119, 21-31.
30. Chen, X., Oppenheim, JJ., Winkler-Pickett, RT., Ortaldo, JR., Howard, OM. (2006): Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur. J. Immunol.* 36, 2139-49.
31. Chen, ML., Yan, BS., Bando, Y., Kuchroo, VK., Weiner, HL. (2008): Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 180, 7327-37.
32. Chen, Z., O'Shea, JJ. (2008): Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine*. 41, 71-78.
33. Chen, LC., Delgado, JC., Jensen, PE., Chen, X. (2009): Direct expansion of human allospecific FoxP3+CD4+ regulatory T cells with allogeneic B cells for therapeutic application. *J. Immunol.* 183, 4094-102.
34. Collison, LW., Chaturvedi, V., Henderson, AL., Giacomini, PR., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, CJ., Brown, SA., Rehg, JE., Jones, ML., Ni, HT., Artis, D., Turk, MJ., Vignali, DA. (2010): IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* 11, 1093-01.
35. Cvetanovich, GL., Hafler, DA. (2010): Human regulatory T cells in autoimmune diseases. *Curr. Opin Immunol.* 22, 753-60.

36. de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., Scheffold, A. (2004): Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34, 2480-88.
37. Deaglio, S., Dwyer, KM., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, JF., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, VK., Strom, TB., Robson, SC. (2007): Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204, 1257-65.
38. Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., Del Papa, B., Zei, T., Ostini, RI., Cecchini, D., Aloisi, T., Perruccio, K., Ruggeri, L., Balucani, C., Pierini, A., Sportoletti, P., Aristei, C., Falini, B., Reisner, Y., Velardi, A., Aversa, F., Martelli, MF. (2011): Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 117, 3921-8.
39. Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G. (2001): Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193, 1303-10.
40. Duggleby, RC., Shaw, TN., Jarvis, LB., Kaur, G., Gaston, JS. (2007): CD27 expression discriminates between regulatory and non-regulatory cells after expansion of human peripheral blood CD4+ CD25+ cells. *Immunology*. 121, 129-39.
41. Dwyer, KM., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, TB., Robson, SC. (2007): CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal*. 3, 171-80.
42. Earle, KE., Tang, Q., Zhou, X., Lium W., Zhum S., Bonyhadi, ML., Bluestone, JA. (2005): In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin. Immunol.* 115, 3-9.
43. Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, CG., Strober, S., Negrin, RS. (2003): CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat. Med.* 9, 1144-50.
44. Ehrenstein, MR., Evans, JG., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, DA., Mauri, C. (2004): Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF $\alpha$  therapy. *J. Exp. Med.* 200, 277-85.
45. Elpek, KG., Yolcu, ES., Franke, DD., Lacelle, C., Schabowsky, RH., Shirwan, H. (2007): Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J. Immunol.* 179, 7295-304.
46. Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, KW., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, ML., Fioretti, MC., Alegre, ML., Puccetti, P. (2003): Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 1206-12.
47. Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, LJ., McHeyzer-Williams, MG. (2009): Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*. 30, 324-35.
48. Ferrante, A., Thong, YH. (1980): Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J. Immunol. Methods*. 36, 109-17.
49. Finton, KA., Strong, RK. (2012): Structural insights into activation of antiviral NK cell responses. *Immunol. Rev.* 250, 239-57.
50. Fletcher, JM., Lonergan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., O'Farrelly, C., Tubridy, N., Mills, KH. (2009): CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 183, 7602-10.
51. Fontenot, JD., Gavin, MA., Rudensky, AY. (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330-36.
52. Fontenot, JD., Dooley, JL., Farr, AG., Rudensky, AY. (2005): Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J. Exp. Med.* 202, 901-06.
53. Fujio, K., Okamura, T., Yamamoto, K. (2010): The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Adv. Immunol.* 105, 99-130.
54. Furtado, GC., Olivares-Villagómez, D., Curotto de Lafaille, MA., Wensky, AK., Latkowski, JA., Lafaille, JJ. (2001): Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Immunol. Rev.* 182, 122-34.

55. Gao, GF., Rao, Z., Bell, JI. (2002): Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends Immunol.* 23, 408-13.
56. Geginat, J., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (2001): Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.* 194, 1711-9.
57. Getnet, D., Grosso, JF., Goldberg, MV., Harris, TJ., Yen, HR., Bruno, TC., Durham, NM., Hipkiss, EL., Pyle, KJ., Wada, S., Pan, F., Pardoll, DM., Drake, CG. (2010): A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol. Immunol.* 47, 595-600.
58. Gilfillan, AM., Beaven, MA. (2011): Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* 31, 475-529.
59. Gołab, K., Krzystyniak, A., Marek-Trzonkowska, N., Misawa, R., Wang, LJ., Wang, X., Cochet, O., Tibudan, M., Langa, P., Millis, JM., Trzonkowski, P., Witkowski, P. (2013): Impact of culture medium on CD4(+) CD25(high)CD127(lo/neg) Treg expansion for the purpose of clinical application. *Int. Immunopharmacol.* 16, 358-63.
60. Gondek, DC., Lu, LF., Quezada, SA., Sakaguchi, S., Noelle, RJ. (2005): Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174, 1783-6.
61. Goodman, WA., Levine, AD., Massari, JV., Sugiyama, H., McCormick, TS., Cooper, KD. (2009): IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J. Immunol.* 183, 3170-6.
62. Goodman, WA., Young, AB., McCormick, TS., Cooper, KD., Levine, AD. (2011): Stat3 phosphorylation mediates resistance of primary human T cells to regulatory T cell suppression. *J. Immunol.* 186, 3336-45.
63. Green, DR., Droin, N., Pinkoski, M. (2003): Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.* 193, 70-81.
64. Grossman, WJ., Verbsky, JW., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, JP., Ley, TJ. (2004): Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 21, 589-601.
65. Haas, J., Hug, A., Viehöver, A., Fritzscheing, B., Falk, CS., Filser, A., Vetter, T., Milkova, L., Korporal, M., Fritz, B., Storch-Hagenlocher, B., Krammer, PH., Suri-Payer, E., Wildemann, B. (2005): Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 35, 3343-52.
66. Han, GM., O'Neil-Andersen, NJ., Zurier, RB., Lawrence, DA. (2008): CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 253, 92-101.
67. Hartigan-O'Connor, DJ., Poon, C., Sinclair, E., McCune, JM. (2007): Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J. Immunol. Methods.* 319, 41-52.
68. Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, JV., Steinman, RM., Nussenzweig, MC. (2001): Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194, 769-79.
69. Henson, SM., Riddell, NE., Akbar, AN. (2012): Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Curr. Opin Immunol.* 24, 476-81.
70. Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, LA., Andreesen, R., Edinger, M. (2004): Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood.* 104, 895-903.
71. Hoffmann, P., Edinger, M. (2006): CD4+CD25+ regulatory T cells and graft-versus-host disease. *Semin. Hematol.* 43, 62-9.
72. Hoffmann, P., Eder, R., Boeld, TJ., Doser, K., Piseshka, B., Andreesen, R., Edinger, M. (2006): Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood.* 108, 4260-7.

73. Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 299, 1057-61.
74. Ivanov, II., McKenzie, BS., Zhou, L., Tadokoro, CE., Lepelley, A., Lafaille, JJ., Cua, DJ., Littman, DR. (2006): The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 126, 1121-33.
75. Jana, S., Campbell, H., Woodliff, J., Waukau, J., Jailwala, P., Ghorai, J., Ghosh, S., Glisic, S. (2010): The type of responder T-cell has a significant impact in a human in vitro suppression assay. *PLoS One*. 5, e15154.
76. Jiang, S., Camara, N., Lombardi, G., Lechler, RI. (2003): Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells ex vivo. *Blood*. 102, 2180-6.
77. Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., Enk, AH. (2001): Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193, 1285-94.
78. June, CH., Blazar, BR. (2006): Clinical application of expanded CD4+25+ cells. *Semin. Immunol.* 18, 78-88.
79. Kadowaki, T., Shimada, M., Inagawa, H., Kohchi, C., Hirashima, M., Soma, G. (2012): Reconsideration of macrophage and dendritic cell classification. *Anticancer Res.* 32, 2257-61.
80. Kansas, GS., Wood, GS., Tedder, TF. (1991): Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J. Immunol.* 146, 2235-44.
81. Kaplan, MH., Schindler, U., Smiley, ST., Grusby, MJ. (1996): Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*. 4, 313-9.
82. Kavvoura, FK., Ioannidis, JP. (2005): CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* 162, 3-16.
83. Kivisäkk, P., Healy, BC., Viglietta, V., Quintana, FJ., Hootstein, MA., Weiner, HL., Khoury, SJ. (2009): Natalizumab treatment is associated with peripheral sequestration of proinflammatory T cells. *Neurology*. 72, 1922-30.
84. Klein, S., Kretz, CC., Krammer, PH., Kuhn, A. (2010): CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood. *J. Invest. Dermatol.* 130, 492-9.
85. Kleinewietfeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Röttschke, O., Falk, K. (2005): CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood*. 105, 2877-86.
86. Kleinewietfeld, M., Starke, M., Di Mitri, D., Borsellino, G., Battistini, L., Röttschke, O., Falk, K. (2009): CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood*. 113, 827-36.
87. Koenen, HJ., Fasse, E., Joosten, I. (2003): IL-15 and cognate antigen successfully expand de novo-induced human antigen-specific regulatory CD4+ T cells that require antigen-specific activation for suppression. *J. Immunol.* 171, 6431-41.
88. Kolaczowska, E., Kubes, P. (2013): Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159-75.
89. Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., Iwakura, Y. (2006): IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 177, 566-73.
90. Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, TR., Bäckström, BT., Sobel, RA., Wucherpfennig, KW., Strom, TB., Oukka, M., Kuchroo, VK. (2007): Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat. Med.* 13, 423-31.
91. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, VK. (2009): IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485-517.
92. Kumar, M., Putzki, N., Limmroth, V., Remus, R., Lindemann, M., Knop, D., Mueller, N., Hardt, C., Kreuzfelder, E., Grosse-Wilde, H. (2006): CD4+CD25+FoxP3+ T lym-

- phocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **180**, 178-84.
93. Lawson, CA., Brown, AK., Bejarano, V., Douglas, SH., Burgoyne, CH., Greenstein, AS., Boylston, AW., Emery, P., Ponchel, F., Isaacs, JD. (2006): Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)* **45**, 1210-7.
  94. Lawson, JM., Tremble, J., Dayan, C., Beyan, H., Leslie, RD., Peakman, M., Tree, TI. (2008): Increased resistance to CD4+CD25<sup>hi</sup> regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* **154**, 353-9.
  95. Levings, MK., Sangregorio, R., Roncarolo, MG. (2001): Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* **193**, 1295-302.
  96. Levings, MK., Bacchetta, R., Schulz, U., Roncarolo, MG. (2002): The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 263-76.
  97. Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, BM., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., Tybulewicz, V., Vignali, D., Clynes, R. (2008): Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.* **180**, 5916-26.
  98. Lim, HW., Broxmeyer, HE., Kim, CH. (2006): Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. *J Immunol.* **15**, 840-51.
  99. Lindley, S., Dayan, CM., Bishop, A., Roep, BO., Peakman, M., Tree, TI. (2005): Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **54**, 92-9.
  100. Liu, MF., Wang, CR., Fung, LL., Wu, CR. (2004): Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* **59**, 198-202.
  101. Liu, W., Putnam, AL., Xu-Yu, Z., Szot, GL., Lee, MR., Zhu, S., Gottlieb, PA., Kapranov, P., Gingeras, TR., Fazekas, de St Groth B., Clayberger, C., Soper, DM., Ziegler, SF., Bluestone, JA. (2006): CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1701-11.
  102. Liu, T., Soong, L., Liu, G., König, R., Chopra, AK. (2009): CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. *Biol. Direct.* **4**, 40.
  103. Luckheeram, RV., Zhou, R., Verma, AD., Xia, B. (2012): CD4+T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 925135.
  104. Lüth, S., Huber, S., Schramm, C., Buch, T., Zander, S., Stadelmann, C., Brück, W., Wraith, DC., Herkel, J., Lohse, AW. (2008) : Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J. Clin. Invest.* **118**, 3403-10.
  105. Lyons, AB., Parish, CR. (1994): Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* **171**, 131-7.
  106. Malek, TR., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., Kong, L. (2002): CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* **17**, 167-78.
  107. Maliszewski, CR., Delespesse, GJ., Schoenborn, MA., Armitage, RJ., Fanslow, WC., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, GR., Poindexter, K., Birks, C., et al. (1994): The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* **153**, 3574-83.
  108. Mandapathil, M., Szczepanski, MJ., Szajnik, M., Ren, J., Lenzner, DE., Jackson, EK., Gorelik, E., Lang, S., Johnson, JT., Whiteside, TL. (2009): Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6348-57.

109. Mandapathil, M., Lang, S., Gorelik, E., Whiteside, TL. (2009): Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J. Immunol. Methods.* 346, 55-63.
110. Mandapathil, M., Hildorfer, B., Szczepanski, MJ., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., Lang, S., Jackson, EK., Gorelik, E., Whiteside, TL. (2010): Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* 285, 7176-86.
111. Mangan, PR., Harrington, LE., O'Quinn, DB., Helms, WS., Bullard, DC., Elson, CO., Hatton, RD., Wahl, SM., Schoeb, TR., Weaver, CT. (2006): Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 11, 231-4.
112. Mellor, AL., Munn, DH. (2004): IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 762-774.
113. Michie, CA., McLean, A., Alcock, C., Beverley, PC. (1992): Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature.* 360, 264-5.
114. Miller, KR. (1987): *Advances in Cell Biology, Volume 1. Division of Biology and Medicine*, Brown University, Providence, RI, USA.
115. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 11, 231-238.
116. Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorocho, G., Sakaguchi, S. (2009): Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 30, 899-911.
117. Miyara, M., Gorocho, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S., Amoura, Z. (2011): Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 10, 744-55.
118. Morgan, ME., Flierman, R., van Duivenvoorde, LM., Witteveen, HJ., van Ewijk, W., van Laar, JM., de Vries, RR., Toes, RE. (2005): Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* 52, 2212-21.
119. Mosmann, TR., Coffman, RL. (1989): Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46, 111-147.
120. Mosmann, TR., Coffman, RL. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.
121. Mottet, C., Uhlig, HH., Powrie, F. (2003): Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 170, 3939-43.
122. Möttönen, M., Heikkinen, J., Mustonen, L., Isomäki, P., Luukkainen, R., Lassila, O. (2005): CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 140, 360-7.
123. Munn, DH., Sharma, MD., Lee, JR., Jhaver, KG., Johnson, TS., Keskin, DB., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, SJ., Burgess, R., Slingluff, CL. Jr., Mellor, AL. (2002): Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297, 1867-1870.
124. Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., Strober, W. (2004): TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J. Immunol.* 15, 834-842.
125. Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, CS., Krammer, PH., Suri-Payer, E. (2007): Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J. Immunol.* 15, 3578-3587.
126. O'Garra, A., Arai, N. (2000): The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 10, 542-550.



127. Ohkura, N., Sakaguchi, S. (2010): Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin. Immunopathol.* 32, 95-106.
128. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., Lenardo, MJ. (2007): CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 8, 1353-1362.
129. Peterson, RA. (2012): Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol. Pathol.* 40, 186-204.
130. Putnam, AL., Vendrame, F., Dotta, F., Gottlieb, PA. (2005): CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.* 24, 55-62.
131. Raimondi, G., Shufesky, WJ., Tokita, D., Morelli, AE., Thomson, AW. (2006): Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J. Immunol.* 176, 2808-16.
132. Read, S., Malmström, V., Powrie, F. (2000): Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 192, 295-302.
133. Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Fischer, A. (2003) : Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ.* 10, 124-33.
134. Roncarolo, MG., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., Levings, MK. (2006): Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* 212, 28-50.
135. Rouse, M., Nagarkatti, M., Nagarkatti, PS. (2013): The role of IL-2 in the activation and expansion of regulatory T-cells and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology.* 218, 674-82.
136. Ryba-Stanisławowska, M., Skrzypkowska, M., Myśliwiec, M., Myśliwska, J. (2013): Loss of the balance between CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+)IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes. *Hum. Immunol.* 74, 701-7.
137. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
138. Sakaguchi, S. (2004): Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 531-62.
139. Schmetterer, KG., Neunkirchner, A., Pickl, WF. (2012): Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J.* 26, 2253-2276.
140. Schmidt, A., Oberle, N., Krammer, PH. (2012): Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol.* 3, 51.
141. Schneider, A., Rieck, M., Sanda, S., Pihoker, C., Greenbaum, C., Buckner, JH. (2008): The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 181, 7350-5.
142. Schneider, A., Long, SA., Cerosaletti, K., Ni, CT., Samuels, P., Kita, M., Buckner, JH. (2013): In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling. *Sci. Transl. Med.* 5, 170ra15.
143. Schuler, PJ., Harasymczuk, M., Schilling, B., Lang, S., Whiteside, TL. (2011): Separation of human CD4+CD39+ T cells by magnetic beads reveals two phenotypically and functionally different subsets. *J. Immunol. Methods.* 369, 59-68.
144. Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, SI., Nanan, R., Kelleher, A., Fazekas, de St Groth B. (2006): Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203, 1693-1700.
145. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S. (2005): Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201, 723-35.

146. Shevach, EM., McHugh, RS., Piccirillo, CA., Thornton, AM. (2001): Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol. Rev.* 182, 58-67.
147. Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., Sakaguchi, S. (2002): Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 3, 135-142.
148. Soilu-Hänninen, M., Laaksonen, M., Hänninen, A. (2005): Hyaluronate receptor (CD44) and integrin alpha4 (CD49d) are up-regulated on T cells during MS relapses. *J. Neuroimmunol.* 166, 189-92.
149. Sojka, DK., Huang, YH., Fowell, DJ. (2008): Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124, 13-22.
150. Starr, TK., Jameson, SC., Hogquist, KA. (2003): Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 21, 139-176.
151. Stassen, M., Fondel, S., Bopp, T., Richter, C., Müller, C., Kubach, J., Becker, C., Knop, J., Enk, AH., Schmitt, S., Schmitt, E., Jonuleit, H. (2004): Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 1303-11.
152. Steinman, RM., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., Nussenzweig, M. (2003): Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann. N Y Acad Sci.* 987, 15-25.
153. Szabo, SJ., Kim, ST., Costa, GL., Zhang, X., Fathman, CG., Glimcher, LH. (2000): A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
154. Szanya, V., Ermann, J., Taylor, C., Holness, C., Fathman, CG. (2002): The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol.* 169, 2461-5.
155. Tang, Q., Henriksen, KJ., Bi, M., Finger, EB., Szot, G., Ye, J., Masteller, EL., McDewitt, H., Bonyhadi, M., Bluestone, JA. (2004): In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 199, 1455-65.
156. Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, TW., Sakaguchi, S. (2000): Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 17, 303-310.
157. Thierfelder, WE., van Deursen, JM., Yamamoto, K., Tripp, RA., Sarawar, SR., Carson, RT., Sangster, MY., Vignali, DA., Doherty, PC., Grosveld, GC., Ihle, JN. (1996): Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382, 171-174.
158. Thomas, ML. (1989): The leukocyte common antigen family. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 339-69.
159. Thornton, AM., Shevach, EM. (1998): CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188, 287-96.
160. Thornton, AM., Donovan, EE., Piccirillo, CA., Shevach, EM. (2004): Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 172, 6519-23.
161. Toubi, E., Kessel, A., Mahmudov, Z., Hallas, K., Rozenbaum, M., Rosner, I. (2005): Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 1051, 506-14.
162. Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J., Dobyszuk, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Myśliwska, J., Hellmann, A. (2009): First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin. Immunol.* 133, 22-6.
163. Ukena, SN., Höpting, M., Velaga, S., Ivanyi, P., Grosse, J., Baron, U., Ganser, A., Franzke, A. (2011): Isolation strategies of regulatory T cells for clinical trials: phenotype, function, stability, and expansion capacity. *Exp. Hematol.* 39, 1152-60.

164. van Amelsfort, JM., Jacobs, KM., Bijlsma, JW., Lafeber, FP., Taams, LS. (2004): CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 50, 2775-85.
165. Van Wauwe, JP., Goossens, JG., Beverley, PC. (1984): Human T lymphocyte activation by monoclonal antibodies; OKT3, but not UCHT1, triggers mitogenesis via an interleukin 2-dependent mechanism. *J. Immunol.* 133, 129-32.
166. Veldhoen, M., Hocking, RJ., Atkins, CJ., Locksley, RM., Stockinger, B. (2006): TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.
167. Veldhoen, M. (2009): The role of T helper subsets in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol.* 21, 606-611.
168. Venigalla, RK., Tretter, T., Krienke, S., Max, R., Eckstein, V., Blank, N., Fiehn, C., Ho, AD., Lorenz, HM. (2008): Reduced CD4+CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 58, 2120-30.
169. Venken, K., Thewissen, M., Hellings, N., Somers, V., Hensen, K., Rummens, JL., Stinissen, P. (2007): A CFSE based assay for measuring CD4+CD25+ regulatory T cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses. *J. Immunol. Methods.* 322, 1-11.
170. Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, JL., Stinissen, P. (2008): Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol* 180, 6411-6420.
171. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, HL., Hafler, DA. (2004): Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971-979.
172. Vignali, DA., Collison, LW., Workman, CJ. (2008): How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.
173. Vissers, MC., Jester, SA., Fantone, JC. (1988): Rapid purification of human peripheral blood monocytes by centrifugation through Ficoll-Hypaque and Sepracell-MN. *J Immunol Methods.* 13, 203-207.
174. Walker, LS., Abbas, AK. (2002): The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2, 11-9.
175. Walker, LS. (2009): Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology.* 126, 466-74.
176. Walunas, TL., Bluestone, JA. (1998): CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J. Immunol.* 15, 3855-3860.
177. Wan, YY., Flavell, RA. (2007): 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol. Rev.* 220, 199-213.
178. Wang, R., Wan, Q., Kozhaya, L., Fujii, H., Unutmaz, D. (2008): Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS One.* 16, e2705.
179. Wood, KJ., Sakaguchi, S. (2003): Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 199-210.
180. Xiao, H., Wang, S., Miao, R., Kan, W. (2011): TRAIL is associated with impaired regulation of CD4+CD25- T cells by regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Immunol.* 31, 1112-9.
181. Yamazaki, T., Yang, XO., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, HS., Ma, L., Panopoulos, AD., Craig, S., Watowich, SS., Jetten, AM., Tian, Q., Dong, C. (2008): CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J. Immunol.* 15, 8391-8401.
182. Yang, XO., Pappu, BP., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, HS., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, AD., Schluns, KS., Watowich, SS., Tian, Q., Jetten, AM.,

- Dong, C. (2008): T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 28, 29-39.
183. Yuan, X., Malek, TR. (2012): Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 73, 773-782.
184. Zheng, SG., Wang, JH., Gray, JD., Soucier, H., Horwitz, DA. (2004): Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J. Immunol.* 172, 5213-5221.
185. Zhou, Q., Yan, J., Putheti, P., Wu, Y., Sun, X., Toxavidis, V., Tigges, J., Kassam, N., Enjoji, K., Robson, SC., Strom, TB., Gao, W. (2009): Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Am. J. Transplant.* 9, 2303-2311.
186. Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., Paul, WE. (2006): GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 16, 3-10.
187. Zinkernagel, RM., Doherty, PC. (1974): Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 248, 701-2.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

®	engl. <i>registered Trade Mark</i> ; registrierte Warenmarke
™	engl. <i>unregistered Trade Mark</i> ; unregistrierte Warenmarke
Abb.	Abbildung
ADCC	engl. <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AICD	engl. <i>activation induced cell death</i> ; aktivierungsinduzierter Zelltod
AIRE	Autoimmun-Regulator-Gen
ALPS	engl. <i>autoimmune lymphoproliferate syndrom</i> ; Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	engl. <i>antigen-presenting cell</i> ; Antigen-präsentierende Zelle
APECED	engl. <i>autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy</i> ; Polyendokrine Autoimmunerkrankung
APO-1	engl. <i>apoptosis-antigen-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-6	engl. <i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
BCR	eng. <i>B cell receptor</i> ; B-Zell-Rezeptor
Ca	Calcium
cAMP	engl. <i>cyclic adenosin monophosphat</i> ; zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR	engl. <i>C-C chemokine receptor type</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CIA	engl. <i>collagen-induced arthritis</i> ; Kollagen-induzierte Arthritis
CTL	engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i> ; zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4</i> ; zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen-4
CXCR	engl. <i>C-X-C motif receptor</i>
DC	engl. <i>dendritic cell</i> ; Dendritische Zelle
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
EAE	engl. <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	lat. <i>et altera</i> ; und andere
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> ; Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FBS/ FCS	engl. <i>fetal bovine serum / fetal calf serum</i> ; Fötales Rinder / Kälberserum
Fc	engl. <i>crystallisable fragment</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	engl. <i>fluorescence minus one</i>
FoxP3	engl. <i>forkhead-box protein P3</i>
FSC	engl. <i>forward scatter</i> ; Vorwärtsstreulicht
FSC-A	engl. <i>forward scatter area</i> ; Vorwärtsstreulicht Fläche
FSC-H	engl. <i>forward scatter height</i> ; Vorwärtsstreulicht Höhe
GATA-3	engl. <i>trans-acting T-cell specific transcription factor-3</i>
GITR	engl. <i>glucocorticoid induced TNF receptor family related gene</i>
HCl	Chlorwasserstoff; Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA-DRB1	engl. <i>human leukocyte antigen-DRB1</i> ; Humanes Leukozyten-Antigen

	MHC-Klasse II (DRB1)
ICOS	engl. <i>inducible T cell costimulator</i>
IDO	Indoleamin 2,3-Dioxygenase
i. e.	lat. <i>id est</i> ; das heißt
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
intm	engl. <i>intermediate</i>
IPEX	engl. <i>immune dysregulation polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrom</i>
ITAM	engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
iT <sub>REG</sub>	induzierte regulatorische T-Zelle
Lag3	engl. <i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LFA	Leukozyten-Funktions-Antigen
LT-α	Lymphotoxin-α
MACS	engl. <i>magnetic-activated cell sorting</i> ; magnetisch-aktivierte Zellsortierung
MBP	Myelin-basisches Protein
MBq	Megabecquerel
Mg	Magnesium
MHC	engl. <i>major-histocompatibility-complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
MS	Multiple Sklerose
mT <sub>REGS</sub>	<i>memory</i> regulatorische T-Zellen
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NET	engl. <i>neutrophil extracellular trap</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	engl. <i>NOD-like receptor</i> ; NOD-ähnliche Rezeptoren
NOD	engl. <i>nucleotid-binding oligomerization domain receptor</i>
nT <sub>REGS</sub>	natürliche regulatorische T-Zellen
o. g.	oben genannt
p.p.	lat. <i>post partum</i> ; nach der Geburt
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i> ; Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i> ; Mononukleäre Zelle aus peripherem Blut
PBS	engl. <i>phosphate buffer solution</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD-1	engl. <i>programmed cell death-1</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy	Phycoerythrin-Cyanin
PRR	engl. <i>pattern recognition receptor</i> ; Muster erkennende Rezeptoren
R	Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
ROR	engl. <i>retinoic acid receptor-related orphan receptor</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> ; Zellkulturmedium
RRMS	engl. <i>relapsing-remitting MS</i> ; schubförmige MS
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SP	engl. <i>single-positive</i> ; einfach positiv
SPMS	engl. <i>secondary-progressive MS</i> ; sekundär-progrediente MS
SSC	engl. <i>side scatter</i> ; Seitwärtsstreulicht
SSC-A	engl. <i>side scatter area</i> ; Seitwärtsstreulicht Fläche
SSC-H	engl. <i>side scatter height</i> ; Seitwärtsstreulicht Höhe
SSC-W	engl. <i>side scatter width</i> ; Seitwärtsstreulicht Weite

STAT	engl. <i>signaling transducer and activator of transcription</i>
T1D	Typ 1 Diabetes
Tab.	Tabelle
TCR	engl. <i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
T <sub>EFFS</sub>	Effektor-T-Zellen
T <sub>H</sub>	follikuläre T-Helferzellen
TNF	engl. <i>tumor necrosis factor</i> ; Tumornekrosefaktor
TGF-β	engl. <i>transforming-growth factor-β</i>
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TLR	engl. <i>toll-like receptor</i> ; Toll-ähnliche Rezeptoren
TSLPR	engl. <i>thymic stromal lymphopoietin protein receptor</i>
T <sub>R</sub> 1-Zelle	regulatorische T-Zelle Typ 1
TRAIL	engl. <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> ; Todesrezeptorligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
VDJ	engl. <i>variable diversity joining</i> ; variable Rezeptorsegmente
VLA	engl. <i>very late antigen</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
μg	Mikrogramm
°C	Grad Celcius
cpm	engl. <i>counts per minute</i>
g	Gramm
Gy	Gray
h	engl. <i>hour</i> ; Stunde
kHz	Kilohertz
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
psi	engl. <i>pound-force per square inch</i>
sec	Sekunde
U	Unit (Enzymeinheit)

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Differenzierung von CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	12
Abb. 2:	Suppressionsmechanismen von regulatorischen T-Zellen	20
Abb. 3:	Vergleich der beiden anti-CD3 AK Klone <i>UCHT1</i> und <i>OKT3</i> für eine polyklonale Stimulation von humanen T <sub>EFF</sub> -Zellen im Suppressions-Test	45
Abb. 4:	Polyklonale Stimulation mit anti-CD3 AK: Klon <i>UCHT1</i> oder <i>OKT3</i> im Vergleich	46
Abb. 5:	Suppressive Aktivität von syngen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen	47
Abb. 6:	Suppressive Aktivität von allogenen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen	48
Abb. 7:	Durchflusszytometrische Isolation von T <sub>REG</sub> -Zellen	50
Abb. 8:	Durchflusszytometrische Isolation von T <sub>EFF</sub> -Zellen	51
Abb. 9:	Hierarchie der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> Subpopulationen	52
Abb. 10:	T <sub>REG</sub> -Zellen supprimieren CD25 <sup>-</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen effizienter als	53

	CD25 <sup>low</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	
Abb. 11:	T <sub>REG</sub> -Zellen supprimieren CD25 <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen effizienter als CD127 <sup>+</sup> CD25 <sup>low</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	54
Abb. 12:	Suppressive Aktivität von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen gegenüber FACS-isolierter CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	56
Abb. 13:	Suppressive Aktivität von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>-</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen	57
Abb. 14:	Suppressive Aktivität von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>-</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen	58
Abb. 15:	Suppressive Aktivität von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>-</sup> und CD49d <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen gegenüber CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> und CD45RA <sup>-</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	59
Abb. 16:	Suppressive Aktivität von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>-</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen gegenüber CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> und CD45RA <sup>-</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	60
Abb. 17:	Suppressive Aktivität von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>+</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen gegenüber CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen und CD45RA <sup>-</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen	61
Abb. 18:	Suppressive Aktivität von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>-</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen ( <i>buffy-coat</i> ) gegenüber CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> und CD45RA <sup>-</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen (peripheres Blut)	62
Abb. 19:	Vergleich der suppressiven Aktivität von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>-</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen mit jeweils 16.000 und 25.000 eingesetzten Zellen / Test	63
Abb. 20:	Proliferation der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>-</sup> T <sub>REG</sub> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD127 <sup>+</sup> T <sub>EFF</sub> -Zellen nach Kultivierung in Medien mit unterschiedlichen humanen Seren	65
Abb. 21:	Suppressive Aktivität der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>-/low</sup> CD49d <sup>-</sup> T <sub>REG</sub> -Zellen nach Kultivierung mit unterschiedlichen humanen Seren	66

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zellmarker von natürlichen regulatorischen T-Zellen (nT <sub>REGS</sub> )	17
Tab. 2:	Chemikalien und Reagenzien	27
Tab. 3:	Medien, Puffer und Lösungen	28
Tab. 4:	Standardtests (Kits)	28
Tab. 5:	Konjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie	29
Tab. 6:	Charakteristika von Fluorochromen für die Durchflusszytometrie	30
Tab. 7:	Antikörper für die Stimulation humaner T-Zellen	30
Tab. 8:	Seren	30
Tab. 9:	Geräte	31
Tab. 10:	Software	31
Tab. 11:	Verbrauchsmaterial	32
Tab. 12:	Geräteeinstellungen des Durchflusszytometers Aria I	40
Tab. 13:	Anzahl der Zellen im Suppressionstest für 16.000 oder 50.000 Zellen / Test	41
Tab. 14:	Klinische Daten der gesunden Spender	48



## **8 Danksagung**

In der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **9 Lebenslauf**

In der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.